

**Mutantenlese zur Isolierung von Zellfokussierungsgenen in**  
***Caenorhabditis elegans***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Katharina Luthe  
aus Heidelberg

1. Referent: Professor Dr. Ralf Schnabel  
2. Referent: Professor Dr. Michael Steinert  
eingereicht am: 08.08.2012  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.11.2012

Druckjahr 2013

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Tagungsbeiträge

Memar, N., Martin K. & Schnabel, R.: A view on the embryogenesis of the *Caenorhabditis family*. (Poster) 17th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles (2009).

Memar, N., Martin, K., Wiekenberg, A. & Schnabel, R.: A screen for temperature-sensitive embryonic lethal mutations affecting cell focussing in *Caenorhabditis elegans*. (Poster) 17th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles (2009)

Memar, N., Martin K. & Schnabel, R.: Never change a running system: A surprising similarity in nematode embryogenesis. (Vortrag) Willy-Hennig-Symposium on Phylogenetics and Evolution, Hohenheim (2009)

Martin, K., Memar, N., Wiekenberg, A., Schiemann, S., Hennig. & C., Schnabel, R.: A screen for temperature-sensitive embryonic lethal mutants affecting cell migration in *Caenorhabditis elegans*. (Poster) EMBO Conference Series - *C. elegans*: Development and Gene Expression, Heidelberg (2010)





## Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei meinem Mentor Prof. Dr. Ralf Schnabel bedanken. Er ermöglichte mir die Bearbeitung dieses spannenden Themas in seiner Arbeitsgruppe. Von seiner Betreuung und Unterstützung konnte ich sehr profitieren. Bei Herrn Prof. Dr. Michael Steinert bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats. Ich danke auch Herrn Prof. Dr. André Fleißner für seine Bereitschaft, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Henning Schmidt danke ich besonders für ausführliche Beratung und Denkanstöße in molekularbiologischen Belangen. Ich habe in unseren Diskussionen viel lernen können. Christian Hennig möchte ich für Hilfe bei der bioinformatischen Analyse meiner Daten, Diskussionsbereitschaft über bioinformatische Methoden und sonstige Problemlösungen im IT-Bereich danken.

Ohne verschiedene aufwendige technische Geräte wären die Versuche in dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Daher möchte ich Prof. Dr. Anthony Hyman für das Überlassen des COPAS Biosort danken. Mein Dank gebührt ebenfalls Dr. Robert Geffers vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, der uns Zugang zu der Beckman Coulter ermöglichte. Für die Möglichkeit des Whole-Genome-Sequencings möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Hobert bedanken. Insbesondere gilt mein Dank auch Dr. Richard Poole, der uns bei allen Fragen bezüglich der Auswertung hilfreich zur Seite stand.

Bei meinen Kolleginnen Nadin Memar und Anne Wiekenberg bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und das nette und produktive Arbeitsklima. Es war eine schöne Zeit! Bei den Technischen Assistentinnen Cathrin Struck, Annette Otto und Christiane Lindemann möchte ich mich für Hilfe und Unterstützung bei den großen und kleinen Problemen im Laboralltag bedanken. Mein Dank gebührt auch den Studenten Sabrina Schiemann, Anja Letz, Jana Zenk und Sophie Ziegler, die an diesem Projekt mitwirkten.

Meinen Eltern möchte ich für die Ermöglichung meines Studiums, ihren Glauben an mich und ihr Vorbild danken. Meinem Mann Jan Martin Luthe danke ich für seine Unterstützung und sein Verständnis während der Zeit meiner Doktorarbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung.....</b>	<b>2</b>
Form – ein faszinierendes Problem.....	2
<b>Wie können wir Form erforschen? .....</b>	<b>2</b>
Die Embryogenese von <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	2
Die Analyse von Embryonen erfolgt mit SIMI Biocell° .....	5
Die Hypothese der Zellfokussierung .....	7
Temperatursensitive Mutanten als Schlüssel und ihre Isolierung .....	9
Die temperatursensitiven Mutanten <i>t3219</i> und <i>t2732</i> .....	10
<b>Ergebnisse.....</b>	<b>12</b>
<b>Isolierung von temperatursensitiven Mutanten .....</b>	<b>12</b>
Durchführung der Mutantenlese NB in Dresden .....	12
Optimierung der Mutantenlese .....	13
Durchführung der Lesen NC, ND, NE und NF In Braunschweig .....	14
Auswertung der erhaltenen Phänotypen .....	16
Beschreibung typischer Phänotypen.....	18
Erste Analysen mittels SIMI° Biocell .....	24
The Million Mutation Project .....	27
<b>Die Zellfokussierungsmutante <i>let-19(t3219)</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>Klonierung des Genes <i>let-19(t3219)</i> .....</b>	<b>28</b>
Klonierung von <i>let-19(t3219)</i> mittels Whole-Genome-Sequencings .....	28
Klonierung von <i>let-19(t3219)</i> mittels konventionellen SNP-Mappings .....	31
Komplementationstest mit SP582 .....	32
Klonierung mittels biolistischer Transformation .....	35
Position der temperatursensitiven Mutation in <i>let-19(t3219)</i> .....	36
<i>let-19(t3219)</i> codiert für eine Einheit des Mediatorkomplexes .....	37
<b>Charakterisierung des Phänotyps von <i>let-19(t3219)</i>.....</b>	<b>39</b>
Verhalten von <i>let-19(t3219)</i> bei permissiver und restriktiver Temperatur .....	39
Test auf maternale oder zygotische Vererbung .....	39
Analyse der embryonalen temperatursensitiven Phase .....	40
Kontrolle der Zellschicksale mittels SIMI° Biocell.....	41
Immunhistochemische Analyse der Gewebedifferenzierung .....	43
<b>Bioinformatische Analyse von <i>let-19(t3219)</i>.....</b>	<b>46</b>
Visualisierung der Zellpositionen mit Distanzkarten.....	46
Visualisierung der Zellbewegung mittels DDMs in <i>let-19(t3219)</i> .....	55
Analyse von Migration und zurückgelegter Luftlinie der Zellen in <i>let-19(t3219)</i> .....	57
Visualisierung der Zellpositionen mit 3D-Repräsentationen in <i>let-19(t3219)</i> .....	63
Detektion der Expression von LET-19 mittels eines GFP-Markergens .....	66
Vergleich der Mutanten <i>let-19(t3219)</i> und <i>let-19(t3205)</i> .....	67
<b>Die Zelladhäsionsmutante <i>t2732</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>Klonierung des Genes <i>t2732</i>.....</b>	<b>70</b>
Klonierung von <i>t2732</i> mittels konventionellem SNP-Mappings.....	70
Komplementation der Mutation mittels einer Duplikation .....	74
Lokalisierung der temperatursensitiven Mutation mittels einer Dreifaktorkreuzung .....	77

Klonierung von <i>t2732</i> mittels Whole-Genome-Sequencings .....	77
Komplementationstest mit <i>let-805(st456)</i> .....	80
Analyse des Knock-Out Stammes RB1184 mit dem Allel <i>ok1230</i> des Genes <i>Y82E9BR.14</i> .....	82
Stummschalten der Kandidatengene mittels RNA-Interferenz .....	84
Klonierung mittels biolistischer Transformation .....	85
<b>Charakterisierung des Phänotyps von <i>t2732</i> .....</b>	<b>88</b>
Verhalten von <i>t2732</i> bei permissiver und restriktiver Temperatur .....	88
<i>t2732</i> wirkt maternal .....	88
Die embryonale temperatursensitive Phase von <i>t2732</i> .....	89
Zelllinienanalysen von <i>t2732</i> .....	90
Immunhistochemische Analyse der Gewebedifferenzierung .....	92
Die DNA-Integrität in <i>t2732</i> scheint normal zu sein .....	95
<b>Bioinformatische Analyse von <i>t2732</i> .....</b>	<b>96</b>
Visualisierung der Zellpositionen mit Distanzkarten .....	96
Visualisierung der Zellpositionen mit 3D-Repräsentationen in <i>t2732</i> .....	102
<b>Exkurs: Sortierung der Zellen in anderen <i>Caenorhabditis</i>-Arten .....</b>	<b>106</b>
<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
<i>let-19(t3219)</i> , der Mediatorkomplex und die Zellfokussierung .....	110
Das Rätsel von <i>t2732</i> .....	112
Phainothes und die Bioinformatischen Methoden .....	114
Die vier Mutantenlesen .....	116
Gibt es überhaupt die perfekte Zellfokussierungsmutante? .....	119
Hat sich die Mutantenlese gelohnt? .....	120
<b>Material und Methoden .....</b>	<b>122</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	122
Lösungen und Medien .....	124
Verwendete Stämme .....	128
Haltung und Manipulation von <i>C. elegans</i> .....	130
Bioinformatische Methoden .....	139
Molekularbiologische Methoden .....	142
<b>Literatur .....</b>	<b>146</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>149</b>

## Zusammenfassung

Eine der großen offenen Fragen der Entwicklungsbiologie ist die Entstehung der biologischen Form. In diesem Zusammenhang formulierte die Arbeitsgruppe von Ralf Schnabel die Zellfokussierungshypothese. Diese besagt, dass Zellen entsprechend ihrem Schicksal einen Positionswert entwickeln und diesen dazu nutzen in einem Sortierungsprozess spezifische Nachbarbeziehungen zu etablieren. Dadurch ergeben sich die Formen der Gewebe im Embryo (Schnabel *et al.*, 2006). In einer Mutantenlese isolierte Arend Hintze mit *t3091* die erste Zellfokussierungsmutante (Hintze, 2007). Nadin Memar zeigte, dass die Mutante *t3091* einen Defekt in der Phosphomannomutase 2 hat (Memar, 2012), was in einer Verminderung der Glykoprotein-Synthese resultiert. Dies führte zu der Hypothese, dass die Zellfokussierung über Glykoproteine auf der Zelloberfläche vermittelt wird.

Um weitere Komponenten des Systems zu identifizieren, wurden umfangreiche Mutantenlesungen nach temperatursensitive Mutanten durchgeführt (Memar, 2012 und Wiekenberg, 2012). Da hierbei alle 1736 isolierten Mutanten sorgfältig charakterisiert wurden, ist eine umfassende und gefragte Mutantenkollektion mit einem weiten phänotypischen Spektrum für die Worm Community entstanden. Als potentielle Adhäsionsmutante wurde *t2732* tiefergehend charakterisiert. Diese Mutante hat Defekte in der Zell-Zell-Adhäsion, dem Zellzyklus und der Ausprägung korrekter Zellschicksale. Die Zellen in dieser Mutante taumeln ziellos durch den Embryo und verbleiben sehr nah bei ihrem Entstehungsort. Überraschenderweise ließ sich trotz Whole-Genome-Sequencing und sorgfältiger Komplementationsversuche die temperatursensitive Mutation nicht bestimmen.

Mit *let-19(t3219)* wurde eine zweite Zellfokussierungsmutante isoliert. Die Zellen haben im prämorphogenetischen Stadium ein korrektes Zellschicksal, wandern jedoch ziellos durch den Embryo. Dabei ist kein Muster zu erkennen: In jedem analysierten Embryo ist die Anordnung der Zellen individuell fehlerhaft. *let-19* ist ein hochkonserviertes Gen, das für eine Untereinheit der CDK-Domäne des Mediatorkomplexes codiert. Über diese Domäne wird spezifisch die Transkription vieler Gene in der Entwicklung geregelt (Cassamassimi *et al.*, 2007). Vermutlich werden ein oder mehrere Gene, die die Zellfokussierung steuern über LET-19 im Mediatorkomplex reguliert.

## Einleitung

*Ihr habt den Weg vom Wurm zum Menschen gemacht, und Vieles ist in euch noch Wurm.*

*Also Sprach Zarathustra*

*Friedrich Wilhelm Nietzsche*

### Form – ein faszinierendes Problem

Eine der großen noch offenen Fragen in der klassischen Biologie ist die Frage nach der Form. Warum ähneln wir unseren Eltern? Auf welche Weise und in welchen Genen sind diese Informationen verschlüsselt?

Die Prinzipien der Vererbung haben den Menschen schon immer fasziniert. Von Mendels ersten Regeln der Vererbungslehre über die Aufklärung der Struktur der DNA bis hin zur Sequenzierung ganzer Genome – das Streben nach neuem Wissen im Bereich der Genetik hat zu gewaltigen Fortschritten geführt. Diese Dissertation soll sich nun einer weiteren, wichtigen und auf den ersten Blick vielleicht trivialen Frage widmen.

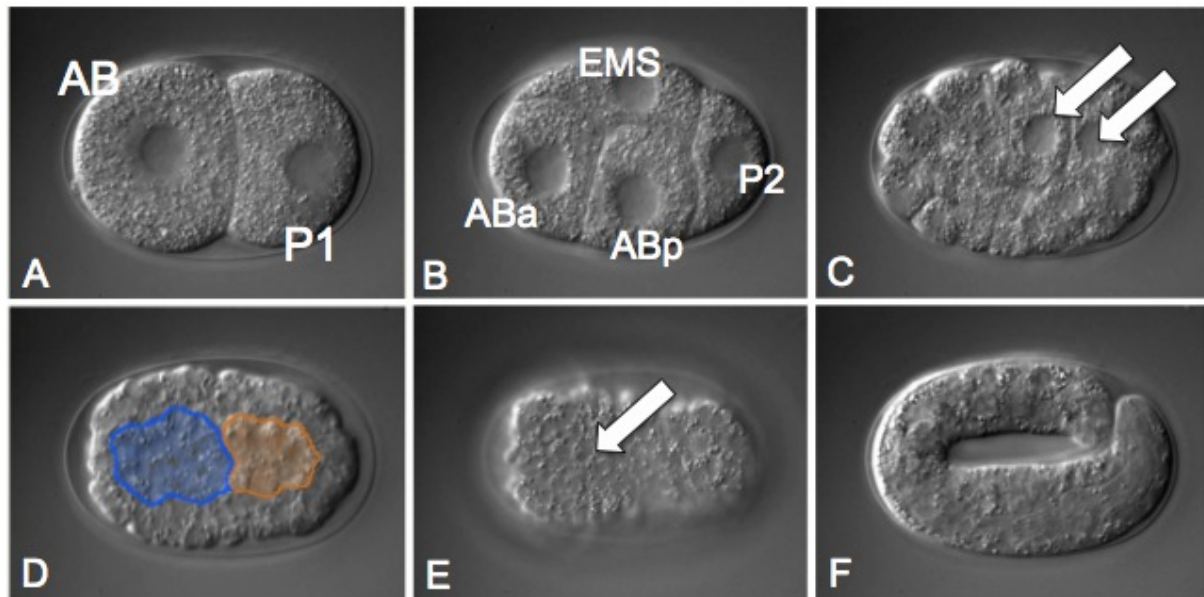
*Wie entsteht Form?*

### Wie können wir Form erforschen?

#### Die Embryogenese von *Caenorhabditis elegans*

Die biologische Form eines Lebewesens bildet sich bei einer direkten Entwicklung größtenteils in der Embryogenese heraus. Daher bietet sich für diese Fragestellung *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus an. Sulston publizierte 1983 die stereotype Zelllinie von *C. elegans* und nannte sie als Beispiel für eine invariante Entwicklung (Sulston *et al.*, 1983). Durch die Technik der 4D-Mikroskopie lässt sich die vollständige Embryogenese des Nematoden aufzeichnen und anschließend analysieren (Schnabel *et al.*, 1997). Als Demonstration, wie detailreich und

aussagekräftig die Aufnahmen des Schnabel-Labors sind, werden charakteristische Entwicklungsschritte eines Wildtyp-Embryos in Abb. 1 dargestellt.



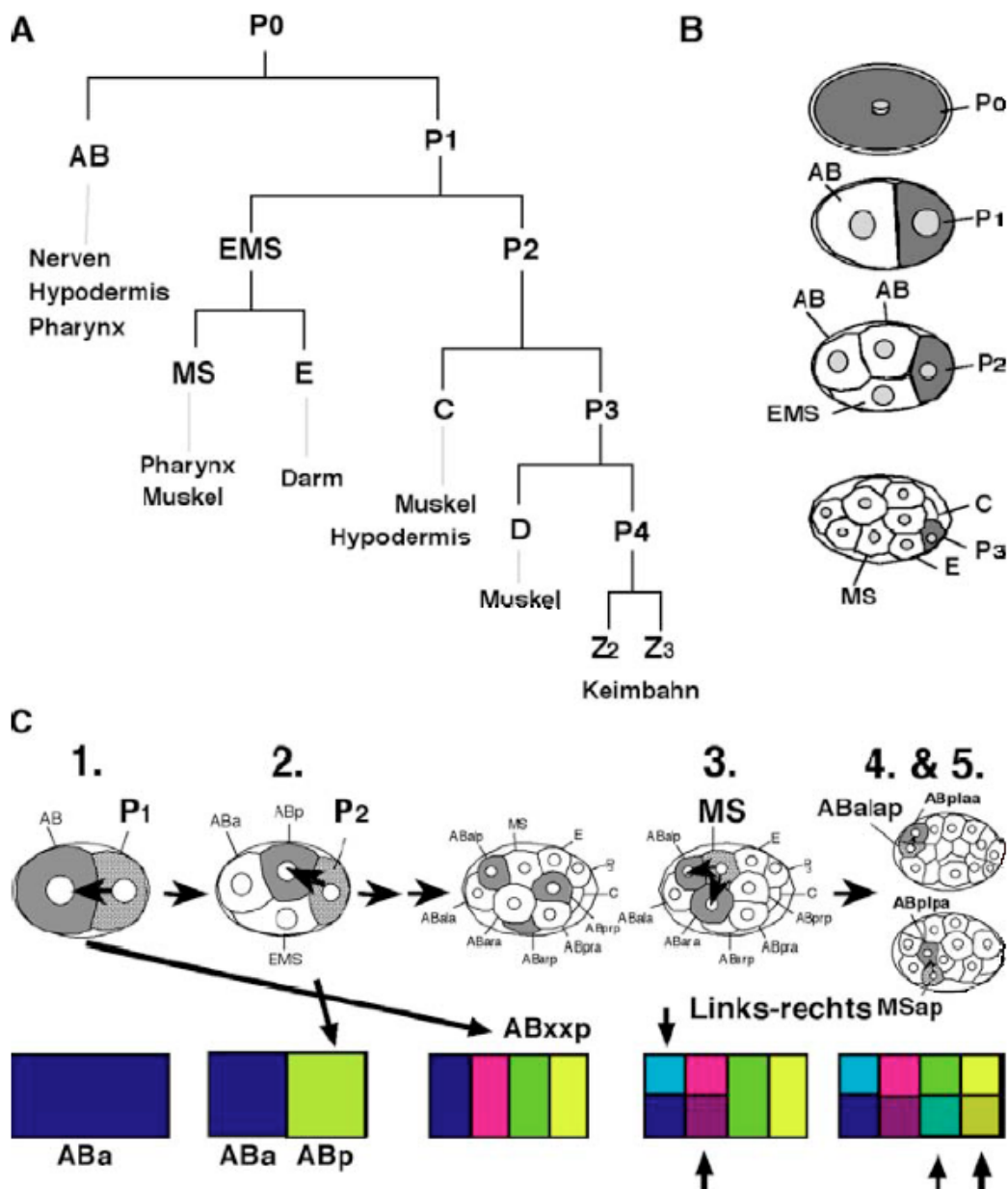
**Abb. 1: 4D-Mikroskopische Aufnahme eines Wildtyp-Embryos**

(A) Das Zweizellstadium mit den Zellen AB und P1. (B) Das Vierzellstadium mit den Zellen ABa, ABp, EMS und P2. (C) Im Zuge der Gastrulation wandern die Darmvorläuferzellen Ea und Ep in das Zentrum des Embryos (Pfeile). (D) Das prämorphogenetische Stadium mit Pharynxcluster (blau) und Darmcluster (braun). (E) Die ventrale Furche wird durch eine Schicht aus Hypodermiszellen geschlossen (Pfeil). (F) Pretzel-Stadium

Die Zygote P0 teilt sich asymmetrisch in die Zellen AB und P1 (Abb. 1 A). AB teilt sich in die anteriore Tochterzelle ABa und die posteriore Tochterzelle ABp. Diese Art der Nomenklatur einer Zelle anhand der Teilungsrichtung wird im Verlauf der Embryogenese beibehalten. P1 teilt sich in EMS und P2. Der Embryo ist nun im Vierzellstadium (Abb. 1 B). Durch weitere Teilungen entstehen insgesamt fünf somatische Vorläuferzellen: AB, MS, E, C und D. Die Keimbahnvorläuferzellen Z2 und Z3 entstehen durch asymmetrische Teilungen in der P-Zelllinie (Abb. 2 A+B).

Die Gastrulation beginnt nach ungefähr 45 Minuten, wenn die Darmvorläuferzellen Ea und Ep einwandern (Abb. 1 C). Nach ungefähr 5 h bei 25°C befindet sich der Embryo im prämorphogenetischen Stadium. Pharynx- und Darmcluster sind gut zu erkennen (Abb. 1 D). Während der Schließung der ventralen Furche umschließen die Epidermiszellen den Embryo (Abb. 1 E). Der Embryo elongiert und erreicht das Zweifach-Stadium. Nach weiterer Zeit im Pretzel-Stadium (Abb. 1 F) schlüpft die Larve, die Embryonalentwicklung ist abgeschlossen.

Die Zellschicksale werden in der Embryonalentwicklung durch ein komplexes Muster von Induktionen festgelegt (Abb. 2 C). Im Zweizeller polarisiert die P1-Zelle über ein MOM-2-Signal die AB-Zelle, so dass dort eine anteriore und eine posteriore Hälfte gebildet wird. Die zweite Induktion findet im Vierzeller statt. Dort erlangt eine AB-Tochter durch Berührung von P2 eine posteriore Identität und erhält das ABp-Schicksal. Als Signal fungiert hier APX-1 mit GLP-1 als Rezeptor. Die Rechts-Links-Achse wird über die dritte Induktion etabliert. Die Zelle MS ordnet der ABara und ABalp-Zelle durch Berührung ihr Schicksal zu. Die Zellen ABala und ABarp behalten das Grundsicksal. Durch die vierte und fünfte Induktion werden alle acht AB-Schicksale festgelegt: ABala, ABalp, ABara, ABarp, ABpla, ABplp, ABpra und ABprp. Mit den Zellen MS, E, C und P3 – die sich kurze Zeit später in D und P4 teilen wird – ergeben sich folglich 12 Gründerzellen. Jede dieser Gründerzellen wird eine spezifische Region im Embryo ausbilden (Hutter & Schnabel, 1994; Hutter & Schnabel, 1995).

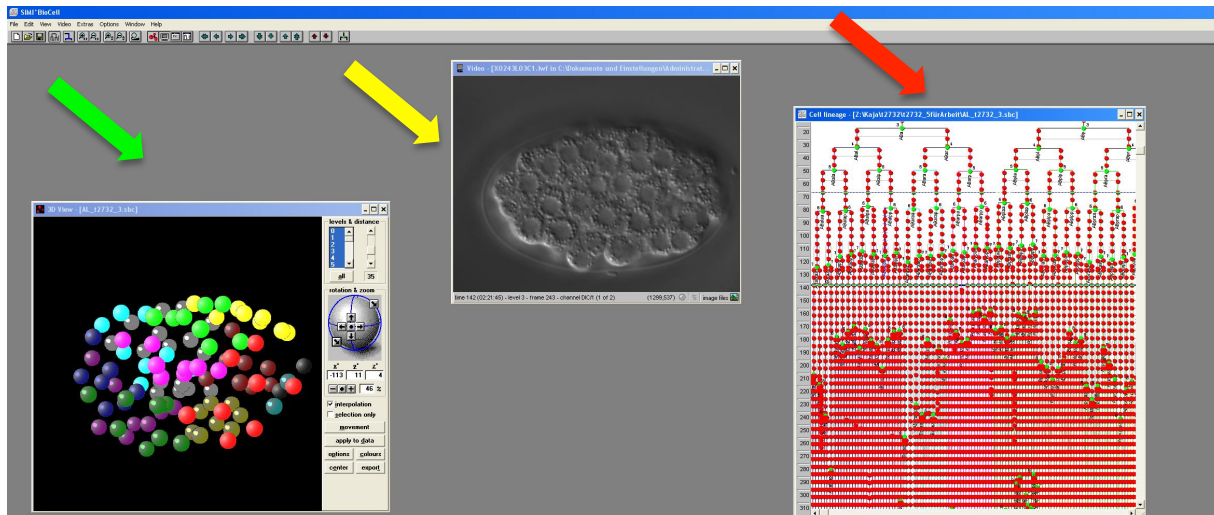


**Abb. 2: Induktionen im Wildtyp-Embryo von *C. elegans*** (A) Stereotype Zelllinie von *C. elegans*. (B) Asymmetrische Zellteilung der Keimbahnvorläuferzellen (P0 – P4). (C) Die fünf Induktionen in der frühen Embryogenese von *C. elegans*. (persönliche Kommunikation Ralf Schnabel)

Die Analyse von Embryonen erfolgt mit SIMI Biocell®

Die Bilder aus Abb. 1 stammen aus einem mehrstündigen Video, dass mit den 4D-Mikroskopen im Schnabel-Labor aufgezeichnet wurde. Zur Analyse solcher Aufnahmen wird das Programm SIMI° Biocell benutzt (Abb.3).





**Abb. 3: Die Oberfläche der Software SIMI Biocell® zum Auswerten der 4D-Aufnahmen**

Mit SIMI Biocell® lassen sich die Zellen eines Embryos in einer 4D-Aufnahme (gelber Pfeil) manuell verfolgen, so dass eine vollständige Zelllinie (roter Pfeil) entsteht. Die Software kann die Position der Zellen dann in einem räumlichen Modell abbilden (grüner Pfeil).

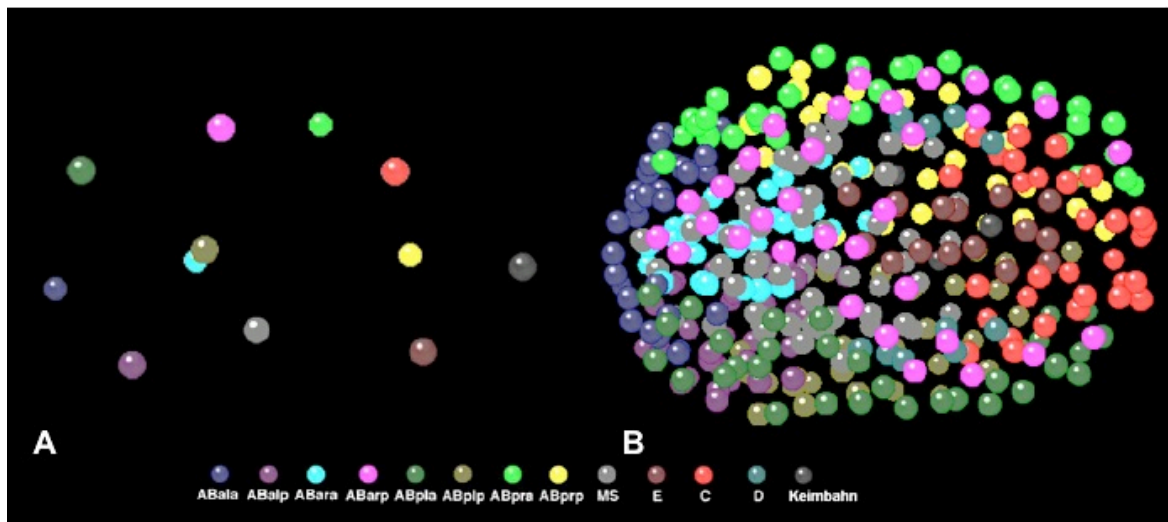
In dem Videofenster (gelber Pfeil) wird die Aufnahme gezeigt. Mit Hilfe der Pfeiltasten lassen sich sowohl Zeit, als auch Ebene steuern. Nun werden die Zellen regelmäßig manuell markiert und Teilungen eingetragen. SIMI Biocell® stellt diesen Datensatz als Zelllinie dar (roter Pfeil). Die sich so ergebenden Koordinaten werden in eine interne Datenbank eingetragen und lassen sich als dreidimensionale Kugelrepräsentation darstellen (grüner Pfeil). Aus den Gründerzellen im Embryo entstehen zwölf Regionen – diese werden mit verschiedenen Farben markiert. So lässt sich eine falsche Positionierung der Zellen schnell und deutlich erkennen.

Bestimmte Zellschicksale, wie Pharynx, Darm, Hypodermis oder Zelltod lassen sich in der Normarskiaufnahme schon mit bloßem Auge bestimmen. Diese Schicksale kann man ebenfalls in der Zelllinie notieren und so Fehler in der Schicksalsverteilung ermitteln und dokumentieren. Mit weiterführenden Methoden der Bioinformatik werden anschließend Migrationen, Zellpositionierungen und Zellteilungen tiefergehend analysiert und verglichen.

Da wir davon ausgehen, dass eine korrekte Ausprägung der Form korrekte Zellschicksale und eine korrekte Zellmigration benötigt, ist SIMI® Biocell ein äußerst effektives Werkzeug.

## Die Hypothese der Zellfokussierung

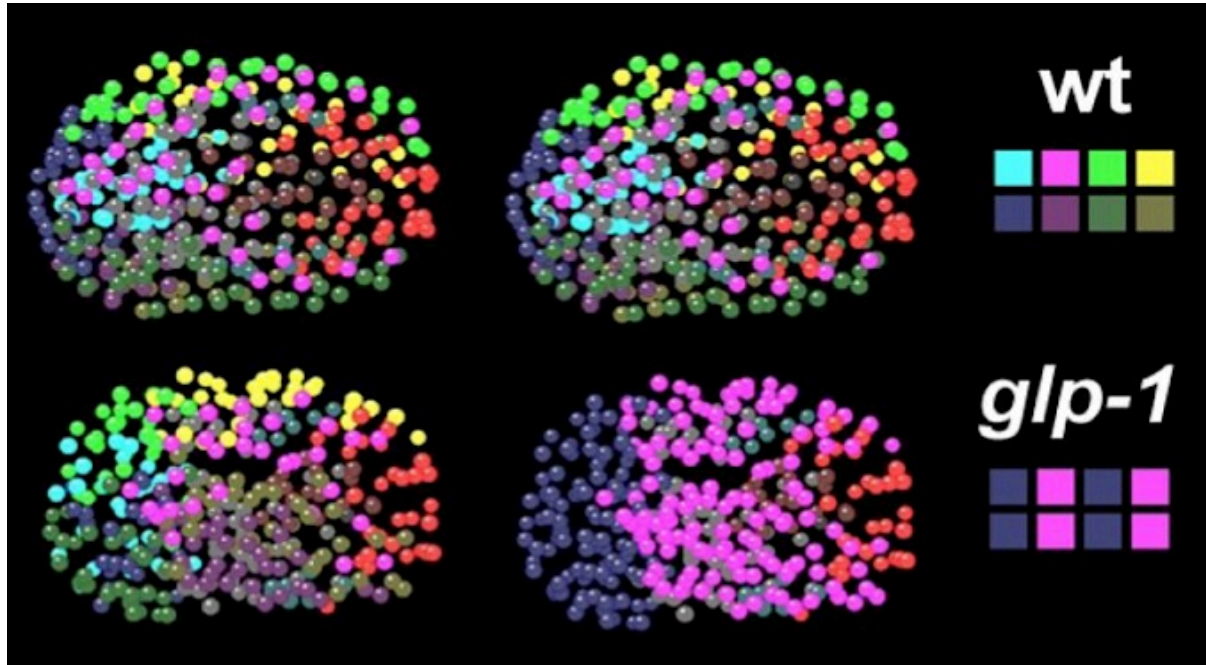
Sulston publizierte 1983 die vollständige embryonale Zelllinie von *C. elegans* und postulierte, dass jede Zelle im *C. elegans*-Embryo dort entstehe, wo sie benötigt werde (Sulston *et al.*, 1983). Eine Positionierung der Zellen sollte ausschließlich durch Zellteilungen geschehen, mit wenigen Ausnahmen, wie der Gastrulation. Die Arbeitsgruppe von Ralf Schnabel konnten allerdings durch 4D-Aufzeichnungen und Analysen der Embryogenese dokumentieren, dass die Zellen im Embryo ihrem Schicksal entsprechend gerichtet wandern und im prämorphogenetischen Stadium definierte Regionen ausprägen (Abb. 4) (Schnabel *et al.*, 2006).



**Abb. 4: Die Vorläuferzellen des *C. elegans*-Embryos formen in der Embryogenese gerichtete Regionen. Der Ursprung der einzelnen Zellen wird mittels des Farbcodes visualisiert. (Anterior: links; dorsale Ansicht) (A) Die Gründerzellen im Zwölfzellstadium. (B) 3D-Repräsentation eines Wildtyp-Embryos. Die Nachkommen der Gründerzellen haben definierte Regionen geformt. (modifiziert aus Schnabel *et al.*, 2006).**

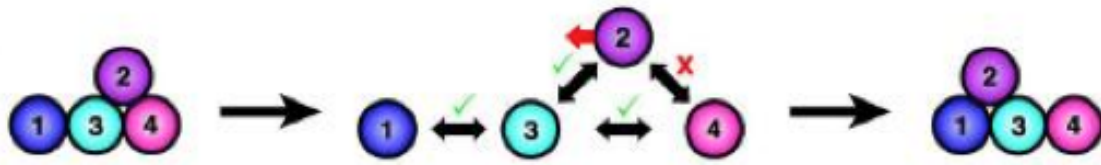
Besonders stark erkennt man diese Zellwanderungen in Mutanten mit drastischen Schicksalstransformationen, wie *glp-1(e2144)* (Hutter & Schnabel, 1994). Dort findet in der Embryogenese nur die erste der fünf Induktionen statt. So werden jeweils viermal die Schicksale ABala und ABarp induziert. Die Zellen versuchen nun sich ihrem Schicksal entsprechend anzuordnen. Im Wildtyp erkennt man deutlich, dass die Zellen mit ABala-Schicksal (dunkelblau) eine Kappe im anterioren Bereich des Embryos bilden (Abb.5). Die Zellen mit ABarp-Schicksal (pink) bilden eine ypsilonförmige Struktur im Embryo. Solche Strukturen sind im Embryo der *glp-1(e2144)*-Mutante zunächst nicht mehr zu erkennen, die Zellen scheinen strukturlos verteilt zu sein. Färbt man die Zellen im Modell jedoch nach ihrem

Schicksal, so erkennt man, dass alle ABala-Zellen in den anterioren Bereich und die ABarp-Zellen in den mittleren Bereich des Embryos wandern. Die Zellen sortieren sich nach ihrem Schicksal und legen dafür erhebliche Distanzen zurück!



**Abb. 5: Vergleich der 3D-Repräsentationen eines Wildtyp-Embryos und der Mutante *glp-1(e2144)*.** In der linken Spalte sind die 3D-Repräsentationen von Wildtyp und *glp-1(e2144)* abgebildet. Die mittlere Spalte zeigt die 3D-Repräsentationen der Embryonen mit Zellen, die nach ihrem vorhergesagten Schicksal eingefärbt sind. In der rechten Spalte sind die acht AB-Schicksale schematisch im Wildtyp-Embryo und in der *glp-1(e2144)*-Mutante aufgeführt (modifiziert aus Schnabel *et al.*, 2006).

Dieser Prozess der Zellsortierung ist noch wenig erforscht. Um die Sortierung erklären zu können, postulierten Meinhard und Schnabel ein Modell: Die Zellfokussierungshypothese (Schnabel *et al.*, 2006). Sie besagt, dass Zellen autonom und von ihrem Schicksal abhängig einen Positionswert generieren und diesen mit benachbarten Zellen vergleichen. Kommt es bei diesem Abgleich zu einer Abweichung, migriert die Zelle aktiv in einen Bereich mit passenden Positionswerten.



**Abb.6: Die Zellfokussierungshypothese** Jede Zelle generiert einen Positionswert (Ziffer). Dieser Positionswert wird abgeglichen und die Zellen migrieren aktiv zu Zellen mit passendem Positionswert (aus Bischoff & Schnabel, 2006)

Es ist noch unklar, wie solch ein Positionswert vermittelt wird. Als momentane Hypothese führen wir eine Art Zuckercode aus verschiedenen definierten Glycoproteinen an der Zelloberfläche an (Memar, 2012).

Es ist davon auszugehen, dass solch ein Mechanismus der Zellmigration essentiell und in der Evolution hochkonserviert ist.

## Temperatursensitive Mutanten als Schlüssel und ihre Isolierung

Von einem Phänotyp zur Untersuchung der Zellfokussierung erwarten wir eine embryonal letale Demonstration von Unordnung. Zellen, die das korrekte Zellschicksal besitzen, migrieren zu falschen Positionen im Embryo.

Eine genauere genetische Untersuchung dieses Phänomens lässt sich mittels zwei verschiedener Herangehensweisen durchführen. In der heute sehr populären Rückwärtsgenetik werden gezielt Gene ausgeschaltet und der daraus resultierende Phänotyp analysiert. Im Schnabel-Labor wurden im Zuge einiger Bachelorarbeiten Gene mittels RNAi ausgeschaltet, deren Genprodukte für späte Zellmigrationen essentiell sind. Es ließ sich nie ein Zellfokussierungs-Phänotyp dokumentieren. Da es noch unklar ist, welche Gene für Zellfokussierung verantwortlich sind, ist der Ansatz der Rückwärtsgenetik hier nicht erfolgsversprechend.

Im Zuge dieser Dissertation soll nun der Ansatz der Vorwärtsgenetik verfolgt werden: In Mutanten mit aussagekräftigen Zellfokussierungs-Phänotypen sollen die defekten Gene identifiziert werden.

Doch wie findet man solche Mutanten? Da Zellfokussierung ein wichtiger und globaler Prozess ist, muss sich die Mutation aus-, bzw. wieder anschalten lassen –

ansonsten können wir nie aus einem lebenden Elterntier kranke, homozygote Embryonen gewinnen, deren maternales und zygotisches Genprodukt eliminiert wurde.

Die Lösung dieses Problems sind temperatursensitive Mutanten. Bei der permissiven Temperatur (hier 15°C) liegt ein funktionsfähiges Genprodukt vor und die Tiere sind lebensfähig und problemlos kultivierbar. Das Genprodukt denaturiert allerdings bei restriktiver Temperatur (hier 25°C) und die Mutation wird sichtbar.

Da der Stamm homozygot für die temperatursensitive Mutation gehalten werden kann, denaturiert bei restriktiver Temperatur auch das eventuell vorliegende maternale Genprodukt. Die Funktion des Genes kann folglich vollständig analysiert werden.

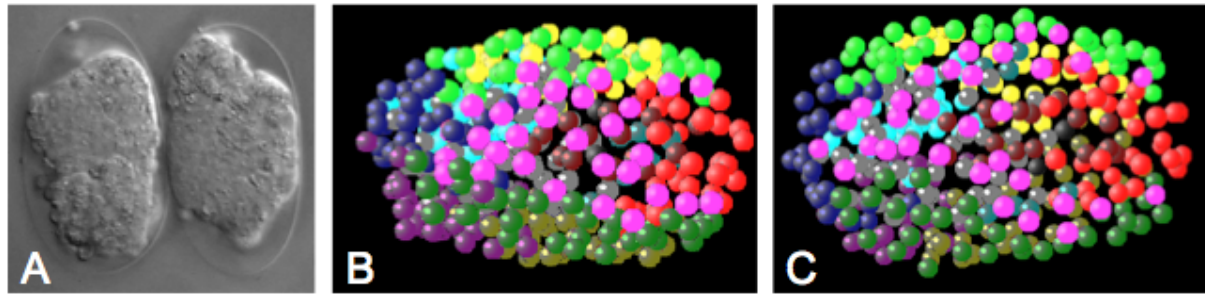
Um temperatursensitive Zellfokussierungsmutanten zu gewinnen, bietet sich die Durchführung einer großangelegten Mutantenlese an. Durch EMS-Mutagenese entsteht hierbei eine große Bandbreite an Mutationen, die anschließend auf Temperatursensitivität selektiert werden. Embryonal letale Kandidaten werden dann weiterführend analysiert. In mehreren Lesungen gewann das Labor von Ralf Schnabel viele Mutanten mit verschiedenen, interessanten Phänotypen. Vier Mutanten mit einem potentiellen Zellfokussierungs-Phänotyp wurden isoliert (Memar, 2012; Wiekenberg, 2012).

### Die temperatursensitiven Mutanten *t3219* und *t2732*

In den verschiedenen Mutantenlesungen fielen unter anderem die Mutanten *t3219* und *t2732* durch interessante Phänotypen auf.

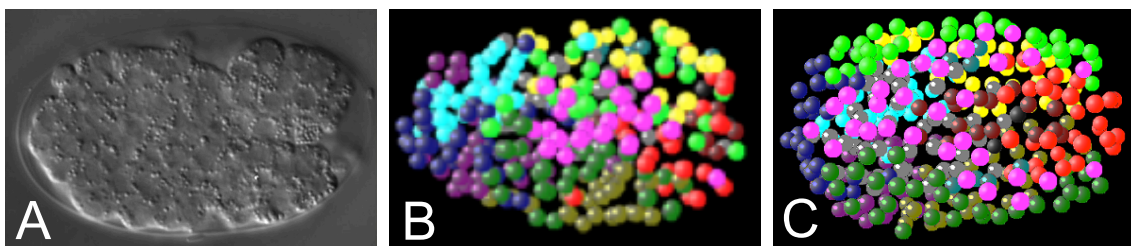
*t3219* wurde in der Mutantenlese NE isoliert. Mit korrekten Zellschicksalen bei falscher Migration ist der Stamm ein guter Kandidat für eine Zellfokussierungsmutante (Abb. 7). Im Zuge dieser Dissertation wurde die Mutation charakterisiert und gezeigt, dass *t3219* für LET-19 kodiert, eine Untereinheit des Mediatorkomplexes, der die Transkription reguliert. Die Domäne, in der LET-19 sitzt, steuert dabei nicht die allgemeine Transkription, sondern gezielt die Transkription spezifischer Gene (Cassamassimi *et al.*, 2007).





**Abb. 7: Die Mutante *t3219*** (A) Normarski-Aufnahme der temperatursensitiven Mutante bei restriktiver Temperatur. (B) In der 3D-Repräsentation der Mutante lässt sich die falsche Positionierung der Zellen erkennen. (C) Die Positionierung der Zellen im Wildtyp als Vergleich.

*t2732* wurde in einer Mutantenlese unter der Leitung von Arend Hintze isoliert (Hintze, 2007). Hintze postulierte, dass dieser Stamm ein perfekter Kandidat für eine Zellfokussierungsmutante sei, da er korrekte Zellschicksale bei falscher Zellpositionierung im Embryo aufwies. In meiner Diplomarbeit versuchte ich vergeblich diese Ergebnisse zu reproduzieren (Martin, 2008). Der von mir beobachtete Phänotyp zeigt einen Defekt in der Zelladhäsion: es bildeten sich großen Hohlräumen zwischen den Zellen im Laufe der Embryogenese. Außerdem traten falsche Schicksalsbildung, ungeordnete Zellmigration und ein gestörter Zellzyklus in der Mutante auf (Abb. 8). Diese Dissertation befasst sich folglich auch mit der Neu-Charakterisierung und Klonierung dieser Mutation.



**Abb. 8: Die Mutante *t2732*** (A) Normarski-Aufnahme der temperatursensitiven Mutante bei restriktiver Temperatur. (B) In der 3D-Repräsentation der Mutante lässt sich deutlich die stark falsche Positionierung der Zellen erkennen. (C) Die Positionierung der Zellen im Wildtyp als Vergleich.

## Ergebnisse

### Isolierung von temperatursensitiven Mutanten

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden fünf Mutantenlesen durchgeführt, mit dem Ziel eine umfassende Sammlung temperatursensitiver Mutanten anzulegen. Der Ablauf solch einer Lese soll hier kurz dargestellt werden. Am Anfang steht die EMS-Mutagenese von L4-Larven. Deren Nachkommen der folgenden F2-Generation werden in Mikrotiterplatten mit Flüssigkultur vereinzelt. Da nur eine Ausbeute von 1% temperatursensitiver Mutanten erwartet wird (persönliche Kommunikation Ralf Schnabel), ist ein großer Ansatz essentiell. Deshalb wurde ein COPAS Biosort verwendet, um die Würmer automatisch zu vereinzeln. Die Platten inkubieren bei der permissiven Temperatur (15°C) um die F2-Generation anzuziehen für eine Woche. Diese Platten werden repliziert und die Kopien auf die restriktive Temperatur (25°C) verbracht. Bei potentiellen temperatursensitiven Kandidaten wächst die Linie hier nicht an – das Well bleibt leer. Die positiven Kandidaten werden identifiziert und in neuen Mikrotiterplatten gesammelt. Es folgt ein erneutes Herstellen von Replikas und ein weiterer Test auf Temperatursensitivität. Fällt dieser Test ebenfalls positiv aus, wird die Linie auf eine kleine NGM-Platte gegeben und ein letztes Mal getestet. Dann folgt die Analyse des Phänotyps und der Stamm wird eingefroren.

### Durchführung der Mutantenlese NB in Dresden

Im Sommer 2008 wurde eine groß angelegte Mutantenlese (NB) unter der Leitung von Nadin Memar am Max-Planck-Institut in Dresden durchgeführt. Dort hatte ein ehemaliger Mitarbeiter von Tony Hyman ein neues Kultivierungsprotokoll entwickelt, dass deutlich vom Standardprotokoll abwich. Ein N2-Männchen-Stamm wurde mittels EMS mutagenisiert. Diese Männchen wurden gekreuzt, um das Auftreten von synthetischen Phänotypen durch eine erste Auskreuzung zu minimieren. Die Nachkommen der F2-Generation wurden mit Hilfe eines COPAS Biosort Wormsorters in 384-Well-Platten mit M9-Medium und dem *E.coli*-Stamm OP50 als Futter vereinzelt. Von diesen Platten wurden mit Hilfe einer Biomek FX von Beckman Coulter Replikas erstellt, die bei der restriktiven Temperatur inkubiert wurden. Temperatursensitive Kandidaten wurden erneut in 384-Well-Platten getestet. Zu einem Test der verbleibenden Kandidaten auf NGM-Platten kam es nicht mehr, da

die vereinzelt Würmer in den 384-Well-Platten bei permissiver Temperatur starben. Die Zugabe von Cholesterol bewirkte zwar eine Verbesserung (Merris *et al.*, 2003), aber ein Großteil der Tiere verendete auf Grund des Sauerstoff- und Nährstoffmangels in den Wells. Es konnten 38 temperatursensitive Mutanten isoliert werden, von denen zwei Mutanten, *t3200* und *let-19(t3205)* einen interessanten Phänotyp zeigten. Diese Mutantenlese gilt als Fehlschlag.

### Optimierung der Mutantenlese

Die Mutantenlese musste nun in Braunschweig erneut optimiert werden.

Die Ausbeute jeder Mutantenlese nimmt nach einmaligem Rückkreuzen stark ab, da auftretende synthetische Phänotypen dann größtenteils wegfallen. Um den großen Aufwand des Rückkreuzens zu minimieren, wurden in der Lese NB mutagenisierte Männchen mit Wildtyp-Hermaphroditen gekreuzt und deren F2-Nachkommen in M9-Medium mit dem *E.coli*-Stamm OP50 als Futter vereinzelt. Dieser Ansatz wurde allerdings für nachfolgende Mutantenlesen verworfen. Eine Beispielrechnung verdeutlicht die Nachteile des Ansatzes:

Es sollen 1000 temperatursensitive Mutationen isoliert werden. Da wir aus vorherigen Ansätzen wissen, dass 1 % der erhaltenen Mutationen temperatursensitiv wirken, benötigen wir 1.000.000 mutagenisierte Würmer in der F2-Generation. Gehen wir davon aus, dass ein Wurm 200 Nachkommen hat, müssen also 5000 Hermaphroditen mutagenisiert werden. Wenn nun stattdessen Männchen mutagenisiert werden, müssen natürlich Kreuzungen angesetzt werden. Da immer fünf Hermaphroditen mit 15 Männchen gekreuzt werden, braucht man für solch einen Ansatz dreimal mehr mutagenisierte Tiere. In Dresden hatte sich außerdem gezeigt, dass sich mutagenisierte Männchen sehr schlecht kreuzen lassen. Ein großer Teil der Hermaphroditen hatte sich selbst befruchtet. Eine Mutagenese von Männchen ist tatsächlich nicht praktikabel. In den folgenden Mutantenlesen wurden deshalb L4-Larven mutagenisiert, die sich selbst befruchteten.

Ein kritischer Faktor in der Flüssigkultur von *C. elegans* ist die Wahl des Mediums. Sowohl S-Medium, als auch M9-Medium werden häufig für Arbeitsschritte mit *C. elegans* verwendet und haben sich im praktischen Arbeiten bewährt.



In Braunschweig wurde folglich ein kleiner Test-Ansatz in 96-Well-Platten durchgeführt, indem die Anzucht von *C. elegans* in S-Medium bzw. M9-Medium mit dem *E.coli*-Stamm OP50 als Nahrung verglichen wurde (Tab.1).

**Tabelle 1: Vergleich der Anzucht-Medien innerhalb der Flüssigkultur**

	Anzucht in S-Medium	Anzucht in M9
Vereinzelte F2-Nachkommen	1536	4320
Prozentualer Anteil an temperatursensitiven Nachkommen	5	2,6

1536 mutagenisierte F2-Tiere wurden in Platten mit S-Medium angezogen. Hier erhielt man 5% potentielle temperatursensitive Kandidaten. In M9 wurden 4320 Tiere angezogen. Hier erhielt man nur 2,6 % potentielle temperatursensitive Kandidaten.

In den folgenden Mutantenlesen wurden Hermaphroditen mutagenisiert und deren F2-Nachkommen in 96-Well-Platten mit S-Medium vereinzelt. Als Futter diente der *E.coli*-Stamm OP50.

### Durchführung der Lesen NC, ND, NE und NF In Braunschweig

Die folgenden vier Mutantenlesen – NC, ND, NE und NF – fanden im Zeitraum von 1/2009 bis 1/2011 in Braunschweig statt. Tony Hyman überließ uns freundlicherweise den COPAS Biosort, so dass wir die Würmer in mehreren Ansätzen vereinzeln konnten.

Insgesamt wurden 379774 F2-Würmer in 96-Well-Mikrotiterplatten vereinzelt. Der Arbeitsaufwand lässt sich auf 20 Tage à 15 Arbeitsstunden beziffern. Die Mikrotiterplatten inkubierten ungefähr acht Tage bei permissiver Temperatur, bis die folgende Generation angewachsen war. Die Replikplatten konnten wir mit einem Biomek FX der Firma Beckman Coulter anfertigen, den uns Dr. Robert Geffers am Helmholtzzentrum für Infektionsforschung freundlicherweise zur Verfügung stellte. Pro Lese wurden drei Tage lang Platten mit Hilfe des Roboters repliziert. Diese Replikas inkubieren ungefähr sieben Tage bei restriktiver Temperatur. Wenn in den Wells danach keine Nachkommen vorhanden sind, beinhaltet die Originalplatte an

dieser Stelle eine potentielle temperatursensitive Mutante. Diese wurden in neue 96-Well-Platten gegeben, erneut repliziert und auf Temperatursensitivität getestet. Nur wenn eine Mutante in beiden Tests bei der restriktiven Temperatur keine Nachkommen hatte, wird die Mutante auf eine kleine NGM-Platte gebracht.

Die Mutanten wurden erneut auf Temperatursensitivität getestet und bei positivem Ergebnis weiterführend untersucht. Dazu wurden die Stämme unter den Doktoranden Nadin Memar, Anne Wiekenberg, der Diplomandin Sabrina Schiemann und mir aufgeteilt. NC wurde von Sabrina Schiemann analysiert (Schiemann, 2009), ND von Anne Wiekenberg (Wiekenberg, 2012), NE im Zuge dieser Arbeit und NF wurde unter Nadin Memar (Memar, 2012), Anne Wiekenberg und mir aufgeteilt (Tab. 2). Alle Stämme wurden aufgereinigt, eingefroren und in einer Datenbank archiviert.

**Tabelle 2: Die Ausbeute der vier Mutantenlesen NC - NF**

Lese	Anzahl vereinzelter F2	Kandidaten nach finalem Test auf Platte	analysiert von
<b>NC</b>	95904	476	Sabrina Schiemann
<b>ND</b>	109344	394	Anne Wiekenberg
<b>NE</b>	70846	317	Katharina Luthe
<b>NF</b>	103680	549	Katharina Luthe/ Nadin Memar/ Anne Wiekenberg

Diese Datenbank enthält neben Name, Einfriernummer und Verknüpfungen zu den 4D-Aufnahmen des Stammes auch wesentliche Merkmale der verschiedenen potentiellen Phänotypen. Hat ein Stamm nun einen Defekt, wird der Phänotyp in der Datenbank als „nicht ok“ klassifiziert. So lassen sich zielgenau Suchabfragen nach bestimmten interessanten Phänotypen durchführen. Da sich in verschiedenen Stämmen mehrere Defekte finden lassen, gibt es natürlich deutlich mehr „beobachtete Defekte“ als Mutanten.

## Auswertung der erhaltenen Phänotypen

Die Analyse mittels 4D-Mikroskopie zeigte ein großes Spektrum an interessanten Phänotypen. Im Zuge dieser Arbeit analysierte ich NE komplett und die Teile NF1-18 und NF38-43 - dies beinhaltet insgesamt 425 Mutanten. In Tabelle 3 ist nun eine Auflistung der beobachteten Phänotypen in der gesamten Mutantenlese und in dem von mir betreuten Teil (NE/NF) dargestellt. Jedem Phänotyp ist ein Kürzel zugeordnet, der eine spätere Suche in Datenbanken vereinfachen soll.

**Tabelle 3: Phänotypen innerhalb der gesamten Lese und im hier diskutierten Teil**

<b>Phänotyp</b>	<b>Gesamt</b>	<b>NE/NF</b>
A1 sterile Hermaphroditen	284	84
A2 degenerierte Adulte <i>Adulte sind zu krank, um Embryonen für Analysen zu gewinnen</i>	53	0
A3 Oozyten <i>ausschließliche Ablage von Oozyten</i>	168	69
A4 osmotisch sensitive Eischale <i>Eier platzen bei Kontakt mit Wasser</i>	63	20
A5 geronnene Eier <i>lysiertes oder festes Cytoplasma</i>	49	9
A6 Entwicklungsende vor dem prämorphogenetischen Stadium	154	58
A7 variable Phänotypen <i>Entwicklungsende in verschiedenen Stadien</i>	198	70
A8 tote Embryonen im Pretzel-Stadium	223	46
A9 Larval letal <i>die Würmer sterben nach dem Schlüpfen</i>	162	28
B1 Änderungen in der Cytoplasmastruktur <i>glattes oder grobkörniges Cytoplasma, zu dotterreich</i>	72	34

C1	Defekte in den ersten Zellteilung <i>die Zygote teilt sich in mehrere Zellen, frühe Zellfusionen oder Cytoplasmaabschnürungen treten auf</i>	83	25
C2	polynukleär <i>zwei oder mehr Zellkerne in Zellen</i>	90	28
C3	Spindeldefekte <i>große, falsch platzierte Spindeln</i>	86	54
C4	defekte Cytokinese <i>Zellfusionen, Cytoplasmaabschnürungen, mehrere Anläufe zur Teilung notwendig</i>	115	36
C5	gestörter Zellzyklus <i>die Zellteilungsabfolge ist verlangsamt, beschleunigt oder asynchron</i>	154	22
D1	Defekte im programmierten Zelltod <i>grob abweichende Anzahl von Zelltoden, Keine Phagozytose</i>	121	44
E1	Gastrulationsdefekt <i>das Einwandern der Darmvorläuferzellen ist gestört</i>	20	15
F1	fehlende asymmetrische Teilungen <i>keine Anlage einer Keimbahn durch symmetrische P-Zell-Teilungen</i>	51	19
F2	defektes Darmcluster <i>falsch platziert oder zu großes bzw. kleines Cluster</i>	43	15
F3	defektes Pharynxcluster <i>falsch platziert oder zu großes bzw. kleines Cluster</i>	57	22
F4	falsche Platzierung der Cluster im prämorphogenetischen Stadium	62	30
F5	Defekte in der Muskelbildung <i>keine Muskelzuckungen</i>	51	5
G1	deformierte Pretzel <i>deutliche Ausprägung von Beulen</i>	136	28
G2	Defekte Ausprägung der Hypodermis <i>falsche Platzierung der Hypodermiszellen</i>	50	20

G3	unvollständiges Schließen der ventralen Furche <i>der Embryo wird nicht von der Haut umschlossen und platzt auf</i>	46	27
G4	Entwicklungsende im prämorphogenetischen Stadium	199	50
G5	gestörte Zelladhäsion <i>Hohlräume zwischen den Zellen</i>	131	60
G6	Schicksalsdefekte <i>die einzelnen Zellen haben ein vom Wildtyp abweichendes Zellschicksal</i>	71	34

Die auftretenden Phänotypen werden im folgenden Abschnitt näher illustriert.

## Beschreibung typischer Phänotypen

In den hier durchgeführten Mutantenlesen erhielten wir viele verschiedenartige Defekte. Das Ergebnis der Lese ist so facettenreich, wie die Forschung in der Worm-Community. So treten mittlerweile führende Arbeitsgruppenleiter an unsere Gruppe heran, da sie unsere Stämme für ihre Forschungsarbeit nutzen möchten. Interessante und populäre Defekte werden in diesem Abschnitt vorgestellt und illustriert.

### *C2 – polynukleäre Zellen*

Ein sehr auffälliger Defekt ist das Auftreten mehrerer Zellkerne in einer Zelle. (Abb. 9 A). Embryonen mit polynukleären Zellen sterben meist vor Erreichen des prämorphogenetischen Stadiums. Mit 90 Kandidaten im gesamten Screen trat dieser Phänotyp häufig auf. Ein zusätzlicher Zellkern kann durch Fehler in der Meiose entstehen. Die Arbeitsgruppe von Carrie Cowan in Wien hat großes Interesse an diesen Mutanten bekundet.

### *C1 - Defekte in frühen Zellteilungen und F1 – fehlende asymmetrische Teilungen*

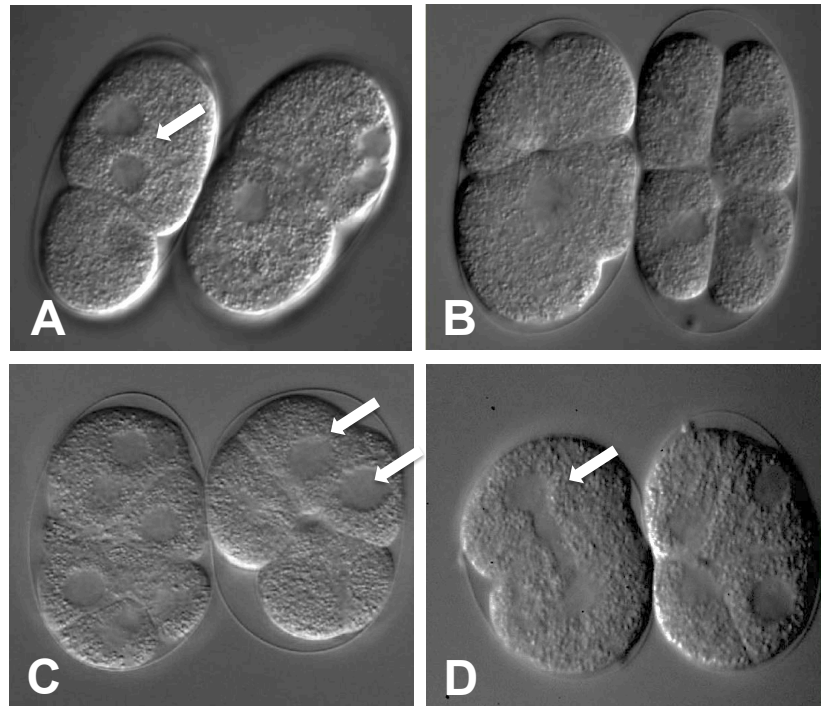
Polynukleäre Embryonen haben oft auch gestörte frühe Zellteilungen. Darunter versteht man Embryonen, die z.B. die frühen Zellteilungen nicht abschließen oder sich fehlerhaft in mehrere Zellen teilen. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm GE6233 (Abb. 9 B). Der linke Embryo hat sich in der ersten Zellteilung in drei Zellen geteilt, die größte Zelle ist ungewöhnlich eingeschnürt. Der rechte Embryo hat sich

kleblattartig in vier Zellen geteilt und zeigt damit einen typischen *par*-Phänotyp. Die PAR-Proteine werden asymmetrisch im Cytoplasma des frühen Embryos verteilt und sind essentiell für die ersten Zellteilungen des Embryos (Gönczy & Rose, 2005).

Durch eine fehlende asymmetrische Teilung der P1-Zelle ist die Anlage der Keimbahn im Embryo gestört (Schnabel & Schnabel, 1990). In einem gesunden Wildtyp-Embryo ist die EMS-Zelle, als Tochter von P1, deutlich größer als die Schwesterzelle P2. Diese asymmetrische Teilung ist zusätzlich für die Etablierung der korrekten Zellschicksale essentiell. Embryonen mit solch schwerwiegenden Effekten erreichen meist nicht das prämorphogenetische Stadium. Ein weiteres Beispiel für fehlende asymmetrische Teilungen ist der Stamm GE6296 aufgezeigt (Abb. 9 C). Im rechten Embryo erkennt man deutlich, dass die EMS und P2-Zelle gleich groß sind.

### *C3 - Spindeldefekte*

Die Maschinerie der frühen Teilungen ist ein akkurater Prozess, dessen Defekte in unserer Lese häufig auffielen. Dazu gehört auch die fehlerhafte Anlage von Spindeln. Der Stamm GE6186 (Abb. 9 D) hat in der ersten Zellteilung zu große und abnormale Spindeln. Solch ein Defekt wird oft von Problemen in der Cytokinese begleitet.



**Abb. 9: Frühe Defekte in der Embryonalentwicklung** (A) Polynukleäre Zellen: In der AB-Zelle erkennt man deutlich zwei Zellkerne (Pfeil). (B) Fehlerhafte erste Zellteilung: Der linke Embryo hat sich in der ersten Zellteilung in drei Zellen geteilt. (C) Keine asymmetrische Zellteilung in der P-Zelllinie: EMS und P2 sind ungefähr gleich groß. (D) Die Spindeln des Embryos sind deutlich vergrößert.

#### *C4 – Defekte in der Cytokinese*

Die Zellteilungen im Zuge der Embryonalentwicklung sind hoch regulierte Prozesse. In einigen Mutanten laufen diese Prozesse nicht mehr korrekt ab. Auffallend sind hierbei die Anhäufung von abgeschnürten Cytoplasmastrukturen (Abb. 10 A), extrem langsame Teilungen und Teilungen mit anschließender Fusion.

#### *C5 – asynchroner Zellzyklus*

Auch der Zellzyklus ist ein fehleranfälliger Prozess. In den Mutanten der Lese fanden wir häufig Mutanten, die ein stark verlangsamtes, beschleunigtes oder sehr asynchrones Teilungsmuster haben. Defekte im Zellzyklus können vielfältige Gründe haben. Anhand der *cib-1*-Mutante (*e2300*) ließ sich zeigen, dass ein Defekt in der Thymidylat-Synthese in einen verzögerten Zellzyklus resultiert. Die Mutante kann vermutlich noch dTTP synthetisieren, aber anscheinend nicht in ausreichenden Mengen, um eine DNA-Replikation in normaler Geschwindigkeit durchzuführen. Dies führt zu einem generell verlangsamten Zellzyklus, in dem vor allem die Interphase der P1-Zelle unnatürlich lange andauert (von Elsner, 2008).

Durch eine Analyse der Embryogenese mittels SIMI° Biocell lässt sich ein asynchrones Teilungsmuster deutlich erkennen (Abb. 10 B). In der Mutante *t2732* findet die siebte Teilungsrunde in AB noch synchron statt, während sich die Zellen in der achten Teilungsrunde zu stark unterschiedlichen Zeitpunkten teilen.

### *G5 – gestörte Zelladhäsion*

Ich habe mich besonders für Mutanten mit Adhäsionsdefekten interessiert. Diese Stämme fallen besonders durch große Hohlräume zwischen den Zellen im Verlauf der Embryonalentwicklung auf (Abb. 10 C). Da eine gestörte Zelladhäsion in einer gestörten Zell-Zell-Kommunikation resultieren kann, findet man oft Stämme, in denen die Schicksale nicht dem Wildtyp entsprechen. Eine dieser Mutanten – *t2732* – wird im Abschnitt „Die Zelladhäsionsmutante *t2732*“ näher behandelt.

Sollten die Schicksale allerdings bei fehlerhafter Zellmigration korrekt sein, wären Mutanten dieser Gruppe auch potentielle Zellfokussierungskandidaten.

### *B1 – veränderte Cytoplasmastruktur*

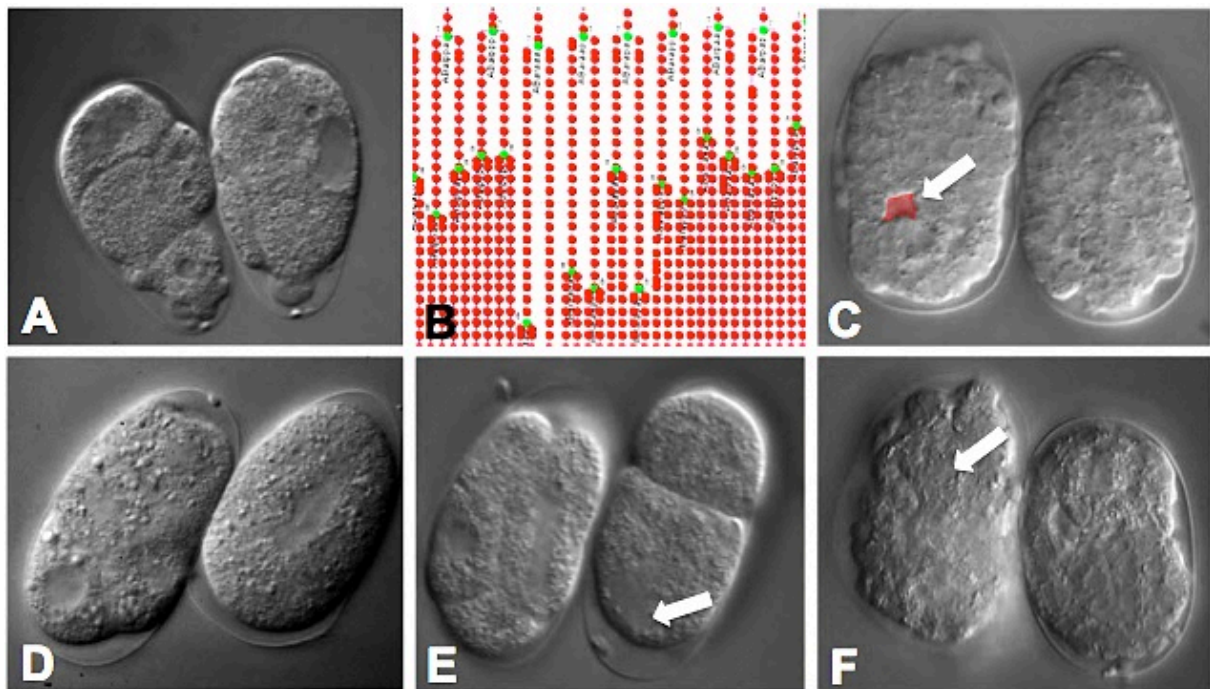
Das Cytoplasma erscheint im Normarski als leicht strukturierte homogene Masse. Veränderungen wie glatte Bereiche (Abb. 10 E) oder besonders grobkörniger Dotter (Abb. 10 D) sind in der mikroskopischen 4D-Aufnahme gut zu erkennen. Die Embryonen entwickeln sich trotz dieser Defekte sehr weit. Die Arbeitsgruppe von Frank Döring in Kiel arbeitet an diesen Mutanten unter ernährungsphysiologischen Aspekten.

### *F3 - defektes Pharynxcluster und G6 - Schicksalsdefekte*

Das Erlangen korrekter Zellschicksale läuft über eine Reihe von Induktionen ab. Ist diese Art der Kommunikation gestört, erhalten Zellen ein falsches Schicksal. Über immunchemische Untersuchungen oder Zelllinienanalysen kann man die Schicksale überprüfen. Eine ganze Reihe von Stämmen unserer Lese fiel durch einen zu kleinen Pharynx auf (Abb. 10 F). Da der Pharynx aus verschiedenen Zelllinien entstammt (ABara, ABalp und MS), können hier durch einzelne falsche Induktionen verschiedene Zellzahlen entstehen. Solch ein Muster findet man im *glp-1(e2144)*-Embryo. Dort findet in der Embryogenese nur die erste der fünf Induktionen statt. So werden jeweils viermal die Schicksale ABala und ABarp induziert und es kann sich



nur der Pharynxanteil aus MS bilden (Hutter & Schnabel, 1994). Mutanten mit diesen schwerwiegenden Defekten sind selbstverständlich embryonal letal.



**Abb. 10: Defekte im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung** (A) Gestörte Zellteilungen. (B) Die Zellen teilen sich stark asynchron. (C) Zwischen den Zellen befinden sich Hohlräume. Die Zelladhäsion scheint gestört. (D) Stark grobkörniges Cytoplasma. (E) Glatte Bereiche im Cytoplasma. (F) Das Pharynxcluster (Pfeil) ist zu klein.

#### *G4 – Entwicklungsende im prämorphogenetischen Stadium*

Potentielle Zellfokussierungskandidaten sind Stämme, die sich recht weit entwickeln, aber dann im prämorphogenetischen Stadium mit einer falschen Zellpositionierung bei richtigen Schicksalen sterben. In der Normarski-Aufnahme fallen hier Kandidaten wie GE5403 (Abb. 11 A) auf. Diese Embryonen starben in einem chaotischen Zustand im prämorphogenetischen Stadium. Aussagen über die Zellschicksale lassen sich anschließend mittels 4D-Analyse gewinnen. In dieser Mutante sind die Schicksale allerdings nicht korrekt, die Verteilung der auftretenden Zelltode weicht stark vom Wildtyp ab.

#### *D1 – Defekte im programmierten Zelltod*

Die Apoptose ist ein hochkomplexer Prozess an dem viele renommierte Arbeitsgruppen forschen. Normalerweise stirbt eine genau definierte Anzahl von Zellen in der Embryonalentwicklung. Bevor die sterbenden Zellen phagozytiert werden, erscheinen sie als glänzende linsenförmige Scheiben im Embryo. Ist die Maschinerie der Phagozytose gestört, werden die Zelltode nicht mehr phagozytiert und wandern bis zum Tod der Mutante durch den Embryo oder erstehen manchmal sogar wieder auf. Sind die Schicksale zusätzlich gestört, kann es zu einer Anhäufung von Zelltoden kommen (Abb. 11 B). Die Mutanten dieser Kategorie werden von dem Labor von Barbara Conradt in München weiter bearbeitet.

#### *G3 – unvollständiges Schließen der ventralen Furche*

Das Schließen der ventralen Furche wird auch als ‚Ventral Enclosure‘ bezeichnet. Die Epidermiszellen wandern in Richtung ventraler Mittellinie und bedecken die inneren Gewebe mit einer Schicht aus einzelnen Zellen. Ist dieser Prozess unvollständig, bleibt eine Spalte in der Epidermis durch die in der weiteren Entwicklung Zellen heraus gepresst werden (Abb. 11 C). Der Embryo wird aufplatzen und in einem chaotischen Zustand sterben.

#### *F4 - falsche Platzierung der Cluster im prämorphogenetischen Stadium*

In der Normarski-Aufnahme lassen sich Pharynx- und Darmcluster deutlich erkennen. Gerade das Darmcluster schimmert durch die Rhabditengranula. Im Wildtyp positionieren sich die Cluster mittig im Embryo. In einigen Mutanten fanden wir eine falsche Positionierung dieser Cluster. Solche Defekte entstehen durch falsche Migrationen einzelner Zellgruppen, die entweder durch Schicksalstransformationen oder Migrationsdefekte ausgelöst werden. Eine entsprechende Mutante ist der Stamm GE5651 (Abb. 11 D). Im linken Embryo liegt das Darmcluster deutlich zu weit am Rand (Pfeil).

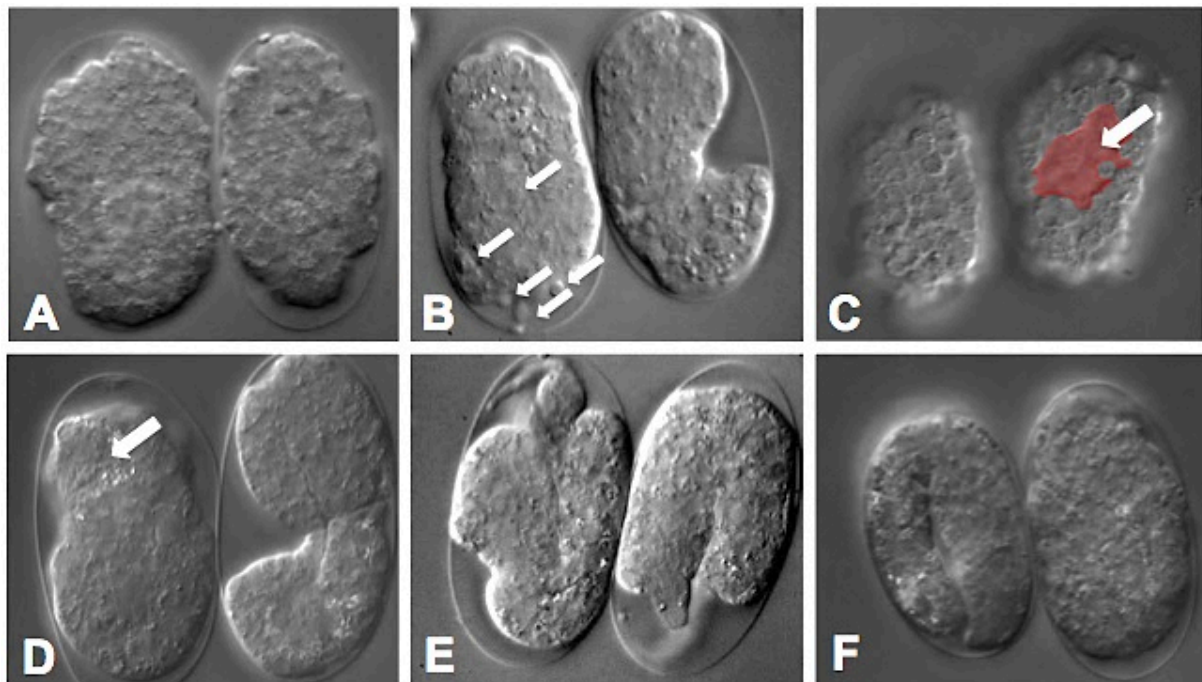
#### *G1 – deformierte Pretzel*

Viele Mutanten erreichen in der Entwicklung das Pretzel-Stadium, können dann aber nicht schlüpfen und sterben im Ei. Häufig tritt der *notched head*-Phänotyp auf, darunter versteht man Pretzeln, die große Beulen im anterioren Bereich ausbilden

(Abb. 11 E). Solch ein ‚Hammerkopf‘ kennt man bisher von Mutanten, wie dem Stamm *vab-1(e2027)* (George *et al.*, 1998).

#### *A7 – variable Phänotypen*

Die einzelnen Phänotypen der Mutanten können in verschiedenen Embryonen unterschiedlich stark ausgeprägt werden. Das führt zu unterschiedlichen terminalen Phänotypen (Abb. 11 F). Gerade in nicht-ausgekreuzten Stämmen ist Vorsicht geboten, da der stärkere Phänotyp nach dem Auskreuzen wegfallen kann. In ausgekreuzten Stämmen ist aber eine Analyse des schwereren Defektes anzuraten, da sich an diesem meist mehr über die früheren Funktionen eines mutierten Gens lernen lässt.



**Abb. 11: Späte Defekte innerhalb der Embryonalentwicklung** (A) Embryonen mit chaotischer Zellpositionierung im prämorphogenetischen Stadium. (B) Anhäufung von Zelltoden (Pfeile). (C) Unvollständige Ventral Enclosure: Die Hypodermiszellen umhüllen den Embryo nicht vollständig (Pfeil). (D) Falsche Platzierung der Cluster im prämorphogenetischen Stadium: Das Darmcluster (Pfeil) ist deutlich zu weit außen. (E) Pretzel mit ausgeprägten Beulen im anterioren Bereich. (F) Unterschiedliche terminale Phänotypen.

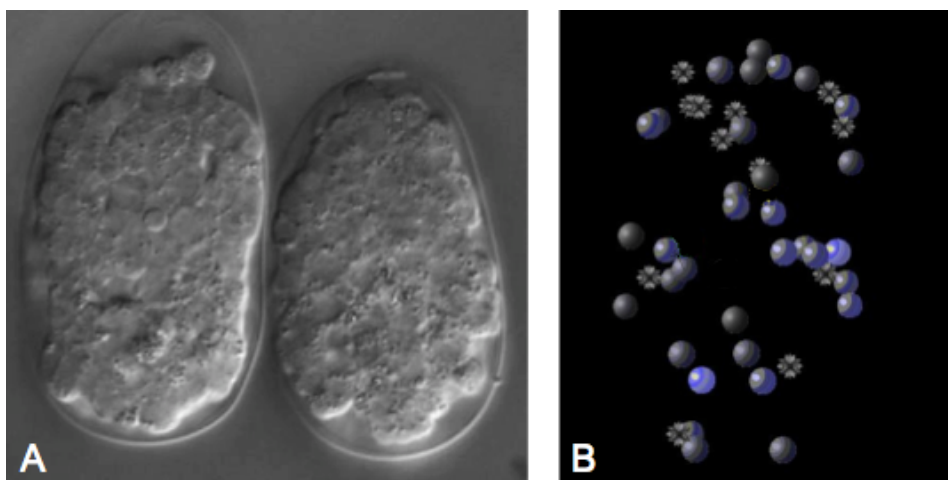
#### Erste Analysen mittels SIMI° Biocell

Als Richtlinie zur Analyse potentieller Zellfokussierungsmutanten wurde ein einheitliches Vorgehen eingeführt. Für eine erste Analyse der Schicksale wird

exemplarisch ein Teil der Zelltode überprüft. Ob die Positionierung der Zellen korrekt ist, wird anhand der jeweils ersten, zwei mittlerer und der letzten Zelle einer Region bestimmt. Diese Zellen werden bioinformatisch mit dem Pendant des Wildtyps verglichen. Liegt in einer Mutante eine falsche Zellpositionierung bei korrekten Schicksalen vor, werden weitere Analysen durchgeführt.

Mittels dieses Vorgehens wurden viele interessante Mutanten entdeckt. Es ließen sich Schicksalsdefekte, Zelltoddefekte und schließlich auch Zellfokussierungsmutanten identifizieren. Exemplarisch werden hier einige interessante Mutanten vorgestellt.

Die Mutante GE6299 zeigte einen Schicksalsdefekt. Nach der neunten Teilungsrunde ließen sich nur fünf korrekte Zelltode in ABala, ABalp, ABplp und ABprp identifizieren. Die anderen Zellen, die normalerweise in die Apoptose eingehen, teilten sich teilweise weiter, bis der Embryo vollkommen deformiert starb (Abb. 12 A). Es traten zusätzliche Zelltode in ABalp, ABpra und MS auf, die sich allerdings nicht mit Transformationen zwischen den Regionen erklären lassen. Die Zelllinie wurde im späteren Verlauf der Entwicklung asynchron. Die Mutante hatte zusätzliche Probleme in der Phagozytose von Zelltod. Die sterbenden Zellen vergrößerten sich stark und wanderten durch den Embryo. Die Positionierung der Zellen war stark fehlerhaft, wobei die größten Fehler in ABala, ABalp und ABprp auftraten (Abb. 12 B). Aufgrund des unspezifischen Phänotyps wurde auf eine weiterführende Analyse verzichtet.



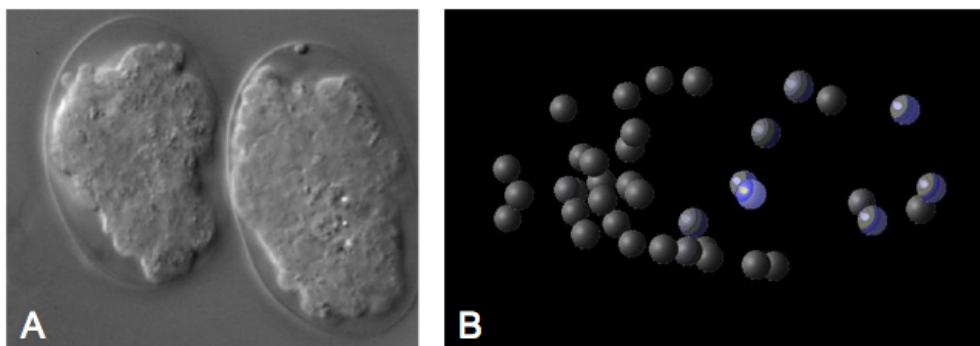
**Abb. 12: Die Mutante GE6299 zeigt eine große Bandbreite an Defekten.** (A) Der Embryo starb im chaotischen Zustand. (B) In der 3D-Repräsentation wurden falsch positionierte Zellen farblich hervorgehoben. Ein Teil der Zellen wies eine fehlerhafte Positionierung auf.

Mit GE5417 wurde eine weitere Schicksalsmutante identifiziert. Der Phänotyp war recht variabel. Während es stark ungeordnete Embryonen mit fehlerhaft platzierten und deformierten Pharynx- und Darmclustern gab, erreichten andere Embryonen das Komma-Stadium (Abb. 13). Die Zellschicksale innerhalb des schwerwiegenden Phänotyps wurden ermittelt. Der Zelltod in MS war zwar vorhanden, aber sämtliche Zelltode in AB fehlten. Fünf der Zellen, die normalerweise im prämorphogenetischen Stadium in die Apoptose eintreten, fehlten komplett, da die Mutterzelle keine neunte Zellteilungsrunde durchlief. Es traten zwei zusätzliche Zelltode innerhalb von ABala und MS auf.



**Abb. 13: Die Mutante GE5417 zeigt einen variablen Schicksalsdefekt.** Im linken Embryo fehlen die Zelltode in AB und es treten zusätzliche Zelltode auf. Der rechte Embryo erreicht ein deformiertes Komma-Stadium.

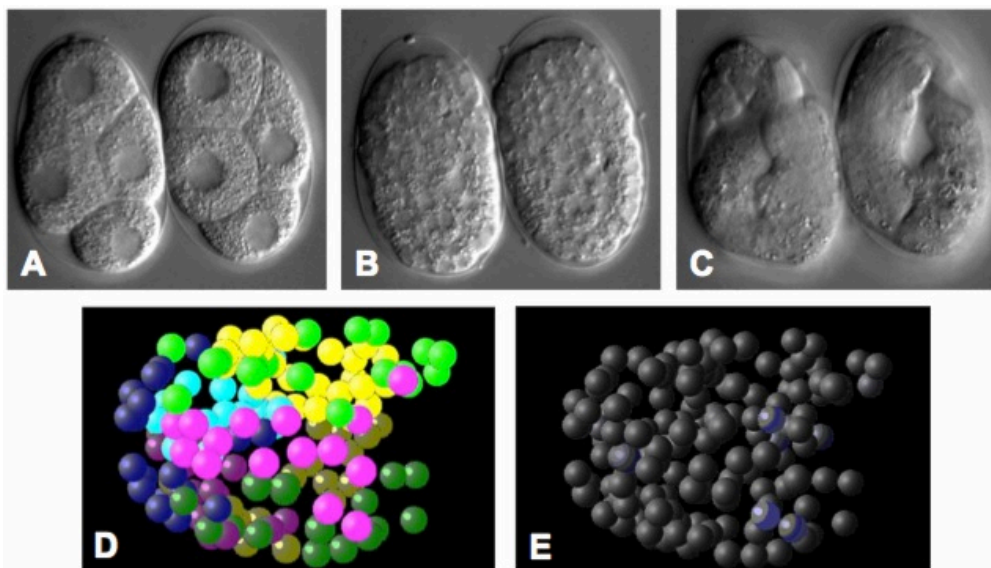
Ein Beispiel für einen synthetischen Phänotyp fanden wir in der Mutante GE5425. Ein chaotischer terminaler Phänotyp bei korrekten Zellschicksalen ließ auf eine interessante Zellfokussierungsmutante hoffen (Abb. 14 A). Ein Teil der Zellen positionierte sich auch abweichend vom Wildtyp (Abb. 14 B). Nach einmaligem Auskreuzen verschwand der Phänotyp. Die Mutante wurde bei restriktiver Temperatur steril.



**Abb. 14: Die Mutante GE5425 hatte vor dem Auskreuzen einen vielversprechenden Phänotyp. Nach erfolgreichem Auskreuzen wurde die Mutante bei restriktiver Temperatur steril.** (A) Der Embryo starb im chaotischen Zustand. (B) In der 3D-Repräsentation wurden falsch positionierte Zellen farblich hervorgehoben. Bei korrekten Schicksalen waren einige Zellen fehlerhaft positioniert.



Ein Beispiel für stark deformierte Pretzeln zeigte die Mutante GE5144. Die Embryonen entwickelten sich zunächst normal (Abb. 15 A+B). Im Pretzel-Stadium entstanden durch Aufreißen der Hypodermis deutliche Beulen im anterioren Bereich und die Embryonen starben (Abb. 15 C). Eine Zelllinienanalyse zeigte, dass die Zellschicksale in der Mutante korrekt waren. Auch die Zellpositionierung im prämorphogenetischen Stadium war unauffällig (Abb. 15 D+E). Der Defekt scheint erst sehr spät in der Entwicklung sichtbar zu werden.



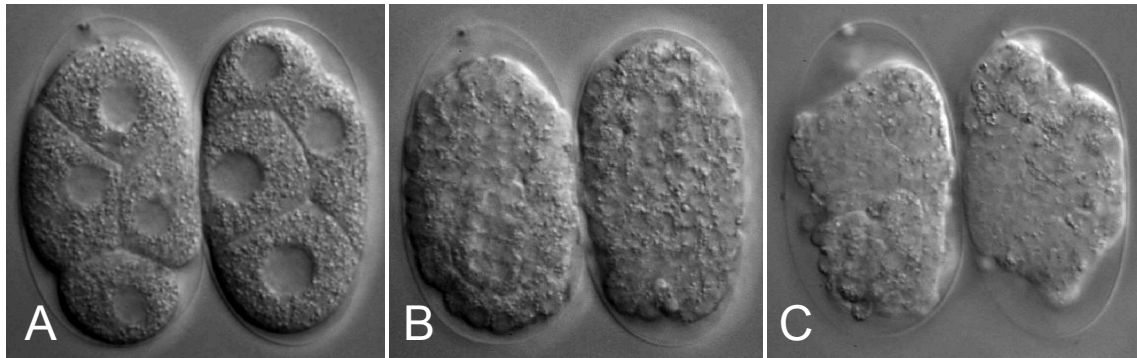
**Abb. 15: Die Mutante GE5144 zeigt als Phänotyp deformierte Pretzeln.** (A) Im Vierzeller glich die Mutante dem Wildtyp. (B) Das prämorphogenetische Stadium war unauffällig. (C) Die Pretzeln zeigten deutliche Beulen im anterioren Bereich. (D) 3D-Repräsentation der Mutante (C) In der 3D-Repräsentation wurden falsch positionierte Zellen farblich hervorgehoben. Nur wenige Zellen waren falsch positioniert.

## The Million Mutation Project

Im Sommer 2011 stellte Professor Don Moerman von der University of British Columbia im Zuge des International Worm Meetings ein ehrgeiziges Forschungsvorhaben vor. Im Zuge des Million Mutation Project möchte er 2000 mutagenisierte Stämme komplett sequenzieren. So soll ein breites Spektrum an neuen SNPs und verschiedenen Mutationen isoliert werden und der Worm-Community zur Verfügung gestellt werden. Don Moerman trat an unsere Arbeitsgruppe heran und bat um 200 verschiedene Mutanten unserer Mutantenlese für dieses Projekt (siehe Anhang). Unsere Arbeitsgruppe wartet gespannt auf die ersten Ergebnisse des Moerman-Labors.

## Die Zellfokussierungsmutante *let-19(t3219)*

Die Mutante *let-19(t3219)* wurde in der Lese NE isoliert. 4D-Analysen zeigten eine Entwicklung, die in einem ungeordneten prämorphogenetischen Stadium endete (Abb. 16). Dieser Phänotyp blieb auch nach zweimaligem Auskreuzen erhalten.



**Abb. 16: Phänotyp der temperatursensitiven Mutante *let-19(t3219)* auf restriktiver Temperatur** (A) Vierzellstadium (B) prämorphogenetisches Stadium (C) terminaler Phänotyp

Im Zuge dieser Arbeit wurde *t3219* als Allel des Genes *let-19* identifiziert. *let-19* kodiert für eine Untereinheit des Mediatorkomplexes, der in der Transkription zwischen Polymerase II und verschiedenen Transkriptionsfaktoren vermittelt (Wang *et al.*, 2004).

## Klonierung des Genes *let-19(t3219)*

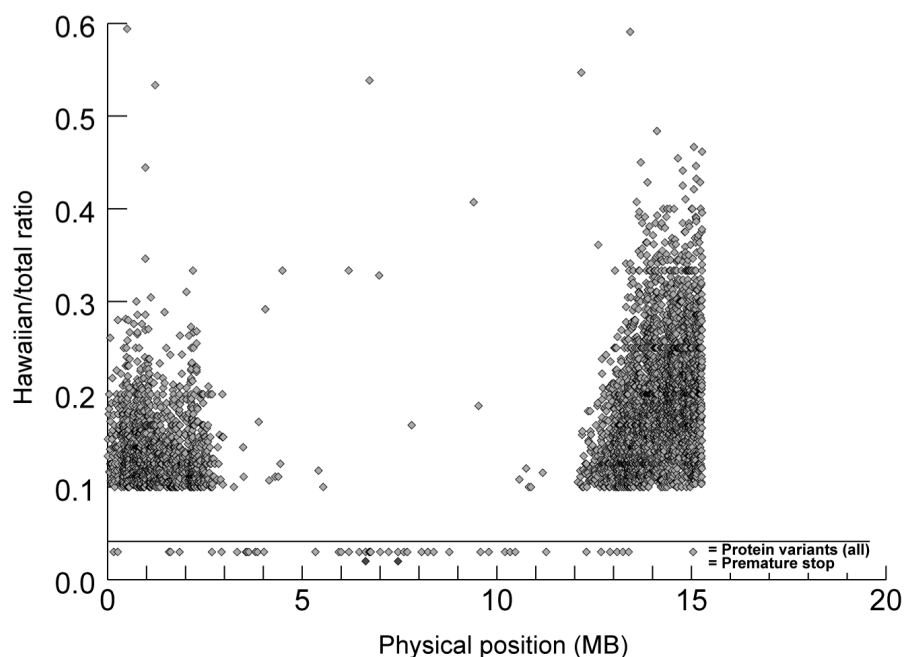
Um die temperatursensitive Mutation in *t3219* zu identifizieren, wurde die Mutante sowohl konservativ kartiert, als auch mittels Whole-Genome-Sequencing analysiert. Die möglichen Kandidaten für die temperatursensitive Mutation ließen sich so auf einige wenige Mutationen beschränken. Diese wurden dann mittels Komplementationstests und biolistischer Transformation überprüft.

### Klonierung von *let-19(t3219)* mittels Whole-Genome-Sequencings

Die Methode des Whole-Genome-Sequencing hat sich in den letzten Jahren etabliert. Im Labor vor Oliver Hobert wurde dieser Ansatz weitergeführt, indem dort SNP-Mapping und Sequenzierung kombiniert wird (Doitsidou *et al.*, 2010 und Sarin *et al.*, 2010). In einem SNP-Mapping wird die zu untersuchende Mutante mit dem Stamm *CB4856* (Hawaii) gekreuzt. Dieser Stamm weist unterschiedliche

Polymorphismen auf (Wicks *et al.*, 2001). Liegen nun temperatursensitive Mutation und der untersuchte Polymorphismus nahe beieinander, werden zwischen ihnen kaum Rekombinationsereignisse stattfinden – man weist folglich überwiegend die Wildtypvariante nach.

Im Zuge einer Kooperation wurde die DNA der temperatursensitiven Mutanten, die in einem SNP-Mapping isoliert wurde, analysiert. Dabei wurden Proteinvarianten untersucht, die sich zwischen dem Wildtyp und *CB4856* unterscheiden. Die Auswertung ergab für *t3219* eine starke Kopplung der temperatursensitiven Mutation an den mittleren Bereich von Chromosom II. Die Verteilung der unterschiedlichen Proteinvarianten auf Chromosom II lässt sich graphisch darstellen (Abb. 17). Je enger das Protein und temperatursensitive Mutation gekoppelt sind, desto weniger Rekombination tritt auf. Das Verhältnis von detektierten Hawaii-Varianten zur Gesamtzahl wird folglich geringer. Im Bereich von 3 – 12 MB ist die Kopplung am stärksten. Die temperatursensitive Mutation scheint in diesem Bereich zu liegen.



**Abb. 17: Verhältnis von detektierten Hawaii-Varianten zur Gesamtanzahl auf Chromosom II nach einem SNP-Mapping von *t3219*.** Im Bereich von 3 – 12 MB ist eine starke Kopplung zu erkennen. Die temperatursensitive Mutation scheint sich in diesem Bereich zu befinden.

Wir erhielten vom Hobert-Lab eine Auflistung von den detektierten Mutationen in proteincodierenden Bereichen im ermittelten Intervall (Abb. 18).



Chr	Start	Reference	Sample	Class	Description	Gene
II	5339416	T	A	missense	GTT->GAT[Val->Asp]	<i>vhp-1</i> (MAP Kinase Phosphatase)
II	5938982	T	C	missense	CTA->CCA[Leu->Pro]	<i>egl-44</i> (Transcription factor)
II	5998649	G	C	missense	GCT->CCT[Ala->Pro]	<i>ins-5</i> (Insulin superfamily)
II	6465615	C	T	missense	GAT->AAT[Asp->Asn]	<i>dgk-5</i> (predicted diacylglycerol kinase)
II	6628853	G	A	premature_stop	TGG->TAG[Trp->stop]	(casein kinase)
II	7219929	C	T	missense	GTT->ATT[Val->Ile]	<i>clh-3</i> (chloride channel)
II	7461329	C	T	premature_stop	TGG->TGA[Trp->stop]	<i>sro-1</i> (serpentine receptor)
II	7611833	T	C	missense	CAC->CGC[His->Arg]	
II	8065748	C	T	missense	CTT->TTT[Leu->Phe]	<i>ufd-2</i> (ubiquitin fusion degradation)
II	8376922	C	T	missense	CCT->TCT[Pro->Ser]	
II	8779476	C	T	missense	CTT->TTT[Leu->Phe]	<i>let-19</i> (thyroid hormon receptor associated)
II	9580028	G	A	missense	GAA->AAA[Glu->Lys]	<i>exc-7</i> (mRNA binding)
II	9792882	C	T	missense	GGA->GAA[Gly->Glu]	<i>cyp-13A3</i> (cytochrome P450 family)
II	10207935	C	T	missense	GCT->GTT[Ala->Val]	(leucin rich repeats protein)
II	10475710	C	T	missense	GGA->GAA[Gly->Glu]	<i>clcc-58</i> (c-type lectin)

**Abb. 18: Die Kombination aus SNP-Mapping und Whole-Genome-Sequencing ergibt eine Liste von Mutationen in proteinkodierenden Bereichen als potentielle temperatursensitive Mutationen für *t3219*.** Die rot hinterlegten Mutationen liegen in dem Bereich der stärksten Kopplung und sind folglich die wahrscheinlichsten Kandidaten.

Die Anzahl der Mutationen in Exons allein im Bereich der temperatursensitiven Mutation war unerwartet. Da parallel zu dieser Sequenzierung die Mutante *sem-4(t3206)* ebenfalls untersucht wurde, konnten gemeinsame Mutationen aussortiert werden. Solche Mutationen waren vermutlich schon im Ausgangsstamm vor der Mutagenese präsent. Jeder Wildtyp-Stamm, der mehrere Generationen wächst, sammelt unbemerkt Mutationen an, die ihn vom ursprünglichen N2 Bristol unterscheiden (Denver *et al.*, 2009).

Die Arbeitsgruppe von Oliver Hobert bemerkte im Zuge der Etablierung ihres Whole-Genome-Sequencing-Verfahrens ebenfalls eine starke Anhäufung von Mutationen in EMS-behandelten Stämmen. Durch wiederholtes Auskreuzen nahm die Zahl der Mutationen zwar ab, aber es bleiben trotzdem erhebliche Unterschiede zum veröffentlichten Wildtyp-Genom. Es wird vermutet, dass der Wildtyp-Stamm einige

heterozygote Mutationen trägt, die im Zuge der Mutantenisolation ebenfalls zufällig homozygot werden (Sarin *et al.*, 2010).

### Klonierung von *let-19(t3219)* mittels konventionellen SNP-Mappings

Zur Überprüfung des Whole-Genome-Sequencings wurde noch ein konventionelles SNP-Mapping durchgeführt. Dazu wurde die Mutante *t3219* mit dem Stamm *CB4856* (Hawaii) gekreuzt. Die unterschiedlichen Polymorphismen in *CB4856* rufen neue Restriktionsschnittstellen in der DNA hervor (Wicks *et al.*, 2001). Durch den Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ergaben sich so deutlich unterschiedliche Bandenmuster im Agarosegel. Die F2-Generation dieser Kreuzung wurde auf Temperatursensitivität getestet. Die DNA der temperatursensitiven bzw. temperaturtoleranten Nachkommen wurde mit Restriktionsenzymen verdaut. Liegt die temperatursensitive Mutation und der zu untersuchende SNP eng zusammen, so fand dort kaum Rekombination statt. In den Proben der temperatursensitiven Nachkommen wird folglich überwiegend das Wildtyp-Bandenmuster auftreten. Es wurde Chromosom II überprüft (Tab. 4).

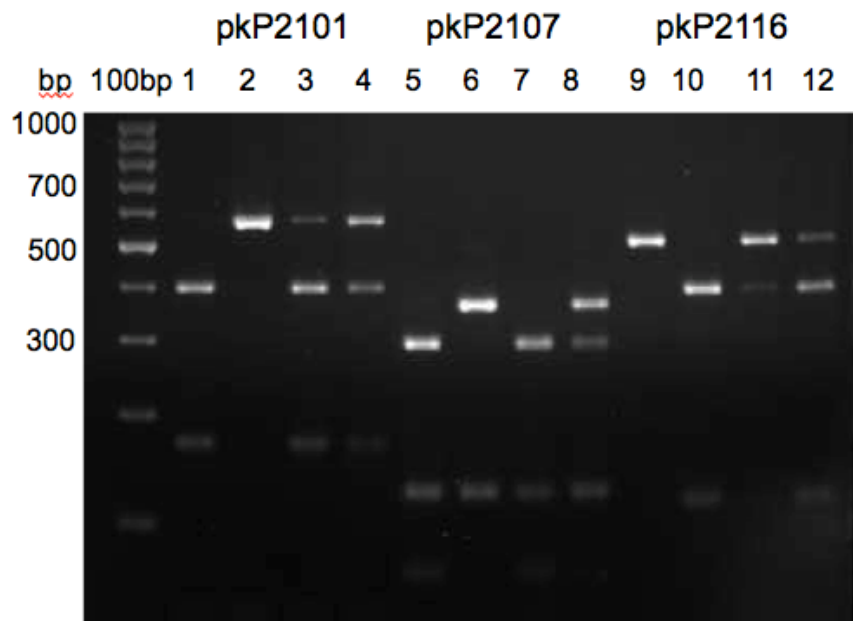
**Tabelle 4: Zur Kartierung verwendete SNPs für *t3219***

SNP	Position	Größe	Restriktionsenzym	Bandenmuster Wildtyp [bp]	Bandenmuster <i>CB4856</i> [bp]
pkP2101	II: -15,91	619	<i>DraI</i>	402, 172, 44	574, 44
pkP2107	II: 0,11	495	<i>DraI</i>	299, 125, 70	369, 125
pkP2116	II: 16,06	516	<i>DraI</i>	516	396, 120

Im mittleren Bereich auf Chromosom II trat eine starke Kopplung zwischen der temperatursensitiven Mutation und dem Wildtyp-SNP pkP2107 auf. Innerhalb der DNA der temperatursensitiven Nachkommen lässt sich hier ausschließlich die Wildtypvariante nachweisen. Zwischen der temperatursensitiven Mutation und diesem SNP scheint kaum Rekombination aufgetreten zu sein.

Die Analyse der anderen SNPs zeigt, dass sich in der DNA der temperatursensitiven Nachkommen sowohl die Wildtyp- als auch die *CB4856*-Variante detektieren lässt. Die temperatursensitive Mutation scheint nicht eng an diese SNPs gekoppelt zu sein.

Die Ergebnisse des Whole-Genome-Sequencing wurden durch das konventionelle SNP-Mapping bestätigt. Die temperatursensitive Mutation *t3219* scheint mittig auf Chromosom II zu liegen.



**Abb. 19: Analyse der SNPs pkP2101, pkP2107 und pkP2116 mittels Agarosegelelektrophorese.**

Links ist DNA aufgetragen, die den SNP pkP2101 beinhaltet: 1) Wildtyp 2) *CB4856* 3) temperatursensitive Nachkommen 4) temperaturtolerante Nachkommen. In Spur 3 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

Mittig ist DNA aufgetragen, die den SNP pkP2107 beinhaltet: 5) Wildtyp 6) *CB4856* 7) temperatursensitive Nachkommen 8) temperaturtolerante Nachkommen. In Spur 7 lässt sich nur die Wildtypvariante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten keine Rekombinationsereignisse auf – es liegt eine enge Kopplung vor.

Rechts ist DNA aufgetragen, die den SNP pkP2116 beinhaltet: 9) Wildtyp 10) *CB4856* 11) temperatursensitive Nachkommen 12) temperaturtolerante Nachkommen. In Spur 11 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

## Komplementationstest mit SP582

Der Stamm SP582 trägt die Defizienz *mnDf46*, die sich auf Chromosom II von 0.89 – 0.91 (genomische Karte) erstreckt (Sigurdson *et al.*, 1984). Damit betrifft sie ausschließlich die Gene *let-19* und *rol-6*. Homozygot ist diese Defizienz embryonal letal, daher ist der Stamm mit dem Balancer *mnC1* balanciert. Somit ergibt sich als Genotyp *unc-4(e120) mnDf46/mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444)II*.

*let-19* ist ein wahrscheinlicher Kandidat für die temperatursensitive Mutation in *t3219*. Daher kann man durch eine Kreuzung ermitteln, ob *mnDf46 t3219* komplementiert.

$$\begin{array}{l}
 \text{P:} \quad \frac{t3219}{t3219} \quad \times \quad \frac{+ \quad unc-4 \quad + \quad mnDf46}{mnC1 \quad dpy-10 \quad + \quad unc-52} \\
 \\
 \text{F1:} \quad \frac{+ \quad t3219}{unc-4 \quad mnDf46} \quad \frac{t3219 \quad + \quad +}{mnC1 \quad + \quad dpy-10 \quad unc-52}
 \end{array}$$

Die F1-Generation wird vereinzelt und auf die restriktive Temperatur gebracht.

$\frac{+ \quad t3219}{unc-4 \quad mnDf46}$	segregiert in...	
	Phänotyp bei Komplementation	Phänotyp bei Nicht-Komplementation
$\frac{unc-4 \quad mnDf46}{unc-4 \quad mnDf46}$	[+]	[+]
$\frac{+ \quad t3219}{unc-4 \quad mnDf46}$	[Wildtyp]	[+]
$\frac{t3219}{t3219}$	[Wildtyp]	[+]

$\frac{t3219 \quad + \quad +}{mnC1 + dpy-10 \quad unc-52}$		segregiert in...
	Phänotyp bei <b>Komplementation</b>	Phänotyp bei <b>Nicht-Komplementation</b>
$\frac{mnC1 + dpy-10 \quad unc-52}{mnC1 + dpy-10 \quad unc-52}$	[ <i>dpy unc</i> ]	[ <i>dpy unc</i> ]
$\frac{t3219 \quad + \quad +}{mnC1 + dpy-10 \quad unc-52}$	[Wildtyp]	[Wildtyp]
$\frac{t3219}{t3219}$	[Wildtyp]	[Wildtyp]

Sollte *t3219* eine temperatursensitive Mutation in *let-19* tragen, komplementiert mnDf46 nicht. In diesem Fall erwartet man von ca. 50 % der vereinzelt F1-Würmer ausschließlich tote Eier. Auf allen anderen Platten sollten auch [*dpy unc*]-Nachkommen zu finden sein.

Es wurden die Gelege von 97 F1-Nachkommen analysiert. 34 Tiere legten nur tote Eier. In den übrigen 63 Gelegen traten [*dpy unc*]-Nachkommen auf. Diese Verteilung weicht deutlich von den statistisch erwarteten 50% ab. Eine Überprüfung mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests ergibt ein Ablehnen der Hypothese. Vermutlich sind innerhalb der vereinzelt F1-Nachkommen die Würmer unterrepräsentiert, die heterozygot für die Defizienz sind. *t3219* legt auch bei der permissiven Temperatur einen Teil tote Eier. Wenn die Defizienz nicht *t3219* komplementiert, wäre folglich davon auszugehen, dass die F1-Individuen mit der Defizienz einen Selektionsnachteil haben.

Da aber insgesamt sowohl Gelege mit nur toten Eiern, als auch mit [*dpy unc*]-Nachkommen auftreten, komplementiert mnDf46 nicht *t3219*. Die temperatursensitive Mutation scheint folglich *let-19* zu sein.

## Klonierung mittels biolistischer Transformation

Mittels biolistischer Transformation wird DNA in die Gonade von Würmern eingebracht. Dort wird sie als extrachromosomales Array an die Nachkommen weitergegeben. Bringt man nun eine funktionsfähige Genkopie in eine temperatursensitive Mutante ein, so können deren Nachkommen auch bei restriktiver Temperatur überleben (Wilm *et al.*, 1999).

Die zu untersuchenden Gene werden in Co-Transformationen mit dem Pharynxmarker *myo-2-mCherry* im Vektor pPD118.33 in die Mutanten eingebracht. So lassen sich transformierte Nachkommen in der F1-Generation schnell und zuverlässig finden.

Die möglichen Kandidaten für die temperatursensitive Mutation sind durch das Whole-Genome-Sequencing schon bekannt. Daher kann man gezielt YACs und Fosmide zur Transformation nutzen, die mutierte Gene komplementieren. Hier wurde die Mutante *t3219* mit dem Fosmid WRM0641aG09 - (beinhaltet das Gen *clec-58*) und dem Fosmid WRM0623aE10 (beinhaltet *let-19*) transformiert. Die Hälfte der Platten beider Schüsse inkubierte bei der permissiven Temperatur und wurde manuell auf den Pharynxmarker pPD118.33ΔΔmCherry selektiert. Die andere Hälfte inkubierte bei der restriktiven Temperatur und wurde so auf Temperatursensitivität selektiert.

**Tabelle 5: Co-Transformation von *t3219* mit *clec-58/let-19* und pPD118.33ΔΔmCherry**

	<i>clec-58</i>	<i>let-19</i>
Selektion auf Temperatursensitivität	3 Linien etabliert, keine leuchtet rot	17 Linien etabliert, 14 leuchten rot
Selektion auf den Pharynxmarker	1 Linie etabliert, keine Nachkommen bei restriktiver Temperatur	6 Linien etabliert, alle Linien haben Nachkommen bei restriktiver Temperatur

Der Mutante *t3219* lässt sich durch das Gen *let-19* komplementieren (Tab. 5). Die große Anzahl Linien bei der restriktiven Temperatur lässt diesen Schluss zu. Dass alle leuchtenden Linien bei der permissiven Temperatur nach Inkubation bei restriktiver Temperatur lebende Nachkommen haben, spricht ebenfalls für diese

Hypothese. Die drei Linien bei restriktiver Temperatur nach Transformation mit *clec-58* stammen vermutlich von revertierten Elterntieren.

Im Zuge der Bachelorarbeit von Jana Zenk wurde das Gen *let-19* aus dem Fosmid WRM0623aE10 isoliert. Dabei wurden auch große Anteile aus den untranslatierten Bereichen berücksichtigt um eine vollständige Expression und Regulation des Genes zu ermöglichen. *let-19* wurde in den Vektor pHE780 kloniert. Dieses Konstrukt wurde als Co-Transformation mit dem Pharynxmarker pPD118.33ΔΔmCherry in die Mutante eingebracht. Bei der restriktiven Temperatur ließen sich 24 unabhängige stabile Linien etablieren, die alle auch den Pharynxmarker exprimierten. Um zu bestätigen, dass es sich bei den Nachkommen bei der restriktiven Temperatur um erfolgreich komplementierte Würmer und nicht um revertierte Tiere handelte, wird der Verlust des Arrays provoziert. Dazu wurden Nachkommen von fünf unabhängigen Linien bei der permissiven Temperatur inkubiert, bis die nächste Generation angewachsen ist. Dann wurden je fünf L4-Larven mit Expression des Pharynxmarkers und je fünf L4-Larven ohne Expression vereinzelt und auf die restriktive Temperatur gebracht.

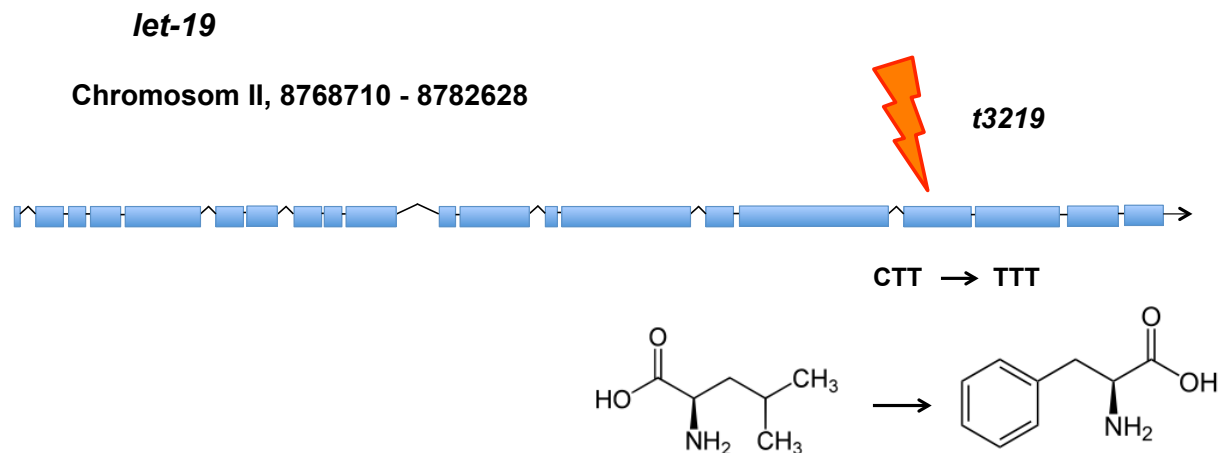
Die Larven ohne Expression des Pharynxmarkers legten nur tote Eier bei restriktiver Temperatur. Die Würmer hatten sowohl das Konstrukt mit *let-19* in dem Vektor pHE780 als auch den Pharynxmarker verloren. 24 Pharynxmarker-exprimierende L4-Larven hatten sowohl lebende Nachkommen, als auch tote Eier. Hier war sowohl das Konstrukt mit *let-19* in dem Vektor pHE780, als auch der Pharynxmarker vorhanden. Allerdings wurden die Arrays nicht an alle Nachkommen vererbt. Eine L4-Larve exprimierte zwar den Pharynxmarker, legte aber später nur tote Eier. Hier war zwar der Pharynxmarker vorhanden, aber das Konstrukt mit *let-19* in dem Vektor pHE780 wurde verloren. So kann die Mutation nicht komplementiert werden.

Der Versuch zeigt deutlich, dass *t3219* die temperatursensitive Mutation in *let-19* ist, da die Mutation vollständig komplementiert wird.

### Position der temperatursensitiven Mutation in *let-19(t3219)*

Das Gen *let-19* besteht aus 20 Exons. Die 8589 Basenpaare codieren für 2862 Aminosäuren. Die temperatursensitive Mutation *let-19(t3219)* liegt im 17. Exon (Abb. 20).

Ein Cytosin wurde durch ein Thymin ersetzt. So wird statt Leucin Phenylalanin eingebaut. Beide Aminosäuren unterscheiden sich erheblich in ihrer Struktur. Dieser Unterschied kann durchaus den temperatursensitiven Effekt bewirken.



**Abb. 20: Die Position der temperatursensitiven Mutation in *let-19*.** Die Mutation liegt im 17. Exon. Statt eines Leucins wird ein Phenylalanin eingebaut.

### *let-19(t3219)* codiert für eine Einheit des Mediatorkomplexes

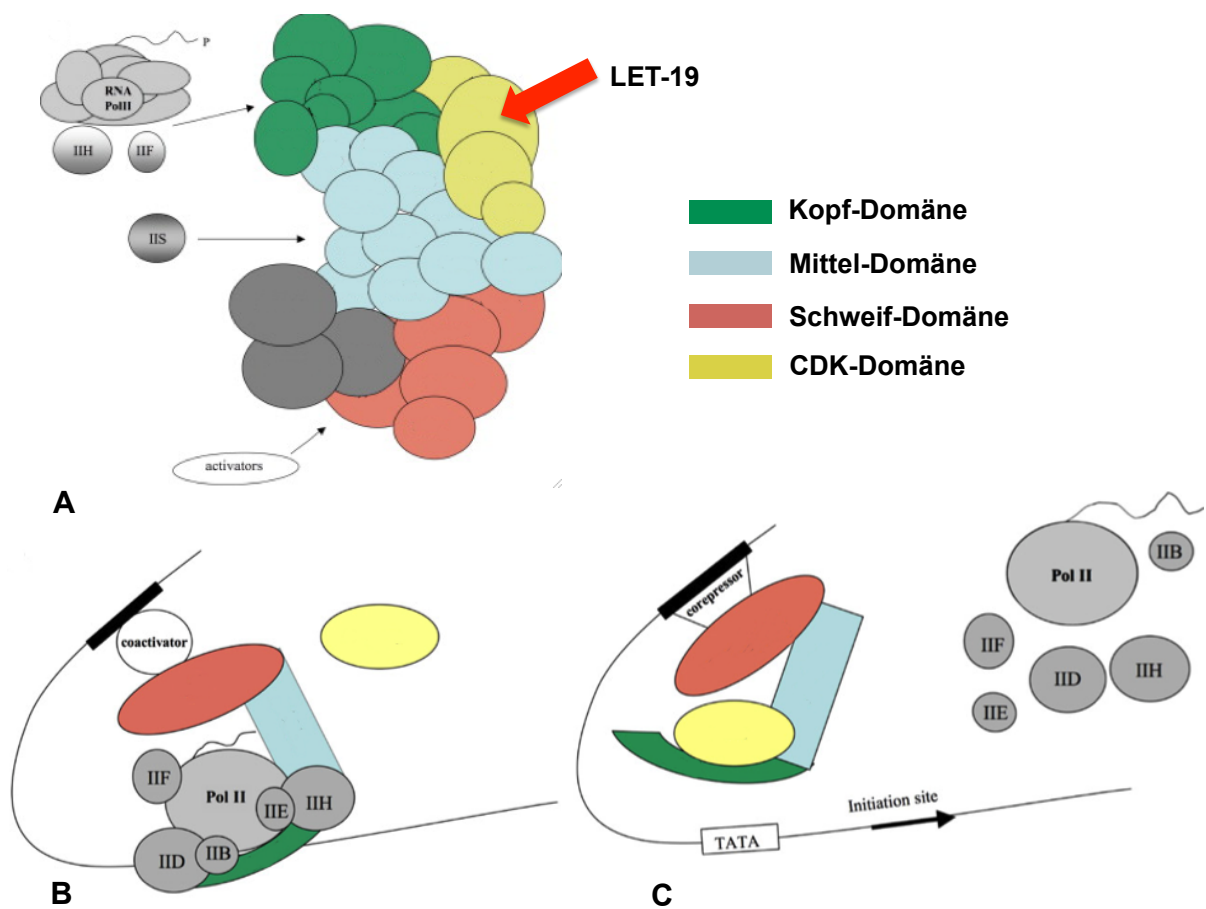
Der Mediator ist ein großer Multiproteinkomplex, der die eukaryotische Transkription der Polymerase II reguliert (Cassamassimi *et al.*, 2007). In der Evolution ist er hochkonserviert – so wird von der Hefe bis zum Menschen die Transkription vieler Gene über den Mediator gesteuert. In Säugetieren besteht der Komplex aus 33 Untereinheiten. 24 dieser Untereinheiten sind bisher in *C. elegans* identifiziert. Diese Untereinheiten bilden vier charakteristische Domänen: Die Kopf-Domäne, die Mittel-Domäne, die Schweif-Domäne und die CDK-Domäne (Abb. 21 A).

Der Mediator funktioniert als eine Art Adapter zwischen den Transkriptionsfaktoren an den regulativen Elementen der DNA und der Polymerase II mit ihren generellen Transkriptionsfaktoren (GTF). Dabei interagiert die Schweif-Domäne des Mediators mit genspezifischen Transkriptionsfaktoren und die Kopf-Domäne mit der unphosphorylierten Form der Carboxy-Terminal-Domäne der Polymerase II. So wird ein Komplex geformt, der das Ablesen der DNA ermöglicht (Abb. 21 B).

LET-19 bildet mit DPY-22, CDK-8 und CIC-1 die CDK-Domäne. Mit Hilfe dieser Domäne wird nicht die generelle Transkription reguliert, sondern die geregelte Transkription spezieller Gene. Diese Domäne hat vor allem eine reprimierende



Wirkung innerhalb der Transkription (Abb. 21 C). Es ließ sich unter anderem zeigen, dass die *wnt*-induzierte Genexpression vermindert ist (Yoda *et al.*, 2005). Es ließ sich allerdings mit einem RNAi gegen *let-19* auch eine positive Funktion der CDK-Domäne nachweisen. Die Transkription verschiedene Gene in der Embryonalentwicklung wird durch den Mediator mit CDK-Domäne aktiviert (Wang *et al.*, 2004).



**Abb. 21: Der Mediator-Komplex** (A) Schematische Darstellung des Mediator-Komplexes in Säugetieren. 24 der 33 Untereinheiten wurden in *C. elegans* bisher nachgewiesen. Der Mediator besteht aus vier Domänen: Kopf-Domäne (grün), Mittel-Domäne (blau), Schweif-Domäne (rot) und der optionalen CDK-Domäne (gelb) zu der LET-19 gehört. (B) Ohne die CDK-Domäne vermittelt der Mediator zwischen Polymerase II und Transkriptionsfaktoren. (C) Die CDK-Domäne reprimiert die Transkription (modifiziert aus Cassamassimi *et al.*, 2007).

Meine Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein oder mehrere Gene der Zellfokussierung durch den Mediator reguliert werden. Bei der restriktiven

Temperatur ist in *let-19(t3219)* die CDK-Domäne gestört, die vermutlich spezifisch die Transkription dieser Gene steuert.

Da LET-19 somit für ein Transkription-vermittelndes Protein codiert, lassen sich keine neuen und tieferen Erkenntnisse über den biologischen Mechanismus der Zellfokussierung lernen.

## Charakterisierung des Phänotyps von *let-19(t3219)*

### Verhalten von *let-19(t3219)* bei permissiver und restriktiver Temperatur

Bei der permissiven Temperatur wächst die temperatursensitive Mutante *let-19(t3219)* ähnlich wie der Wildtyp. Die durchschnittliche Gelegegröße beträgt 197 +/- 34 Larven, 15 +/- 15 Oozyten und 11 +/- 7 tote Eier. Vergleichend dazu produziert der Wildtyp 269 +/- 58 Larven, 15 +/- 10 Oozyten und 1 +/- 1 totes Ei.

Bei der restriktiven Temperatur ist die Mutante strikt temperatursensitiv. Bringt man Larven im L4-Stadium auf die restriktive Temperatur legen sie im Mittel 51 +/- 22 tote Eier und 23 +/- 30 Oozyten. 0,5 +/- 2 Larven schlüpfen und entwickeln sich zu adulten Würmern, haben dann aber in der nächsten Generation keine lebenden Nachkommen (Tab. 6).

**Tabelle 6: Vergleich der Gelegegröße von N2 und *let-19(t3219)***

	Nachkommen	Oozyten	tote Eier
N2	269 +/- 58	15 +/- 10	1 +/- 1
<i>let-19(t3219)</i> permissive Temperatur	197 +/- 34	15 +/- 15	11 +/- 7
<i>let-19(t3219)</i> restriktive Temperatur	0,5 +/- 2	23 +/- 30	51 +/- 22

### Test auf maternale oder zygotische Vererbung

Das Transkript eines strikt maternalen Genes muss dem Embryo von der Mutter zur Verfügung gestellt werden. Dies unterscheidet maternale Gene von zygotischen Genen, deren embryonale Expression ausreichend für die Entwicklung des Embryos ist. Um *let-19(t3219)* auf maternale bzw. zygotische Vererbung zu überprüfen, wurde

die Mutante mit Wildtyp-Männchen gekreuzt. Die heterozygoten Würmer der F1-Generation wurden auf die restriktive Temperatur gebracht ( $n=10$ ). Dort hatten sie im Mittel  $120 \pm 35$  lebende Nachkommen und  $0,8 \pm 1$  tote Eier. Die Nachkommen wurden vereinzelt ( $n = 30$ ). Von ihnen legten 23,3% ausschließlich tote Eier. *let-19(t3219)* wirkt folglich maternal.

Als weiterer Test wurde eine Kreuzung von *let-19(t3219)* mit N2-Männchen direkt bei  $25^{\circ}\text{C}$  durchgeführt um zu überprüfen, ob strikt maternale Vererbung auftritt. Die vereinzelt Hermaphroditen legten im Mittel ( $n=5$ )  $57 \pm 23$  tote Eier und  $34 \pm 20$  Oozyten. Die Vererbung von *let-19(t3219)* ist folglich strikt maternal.

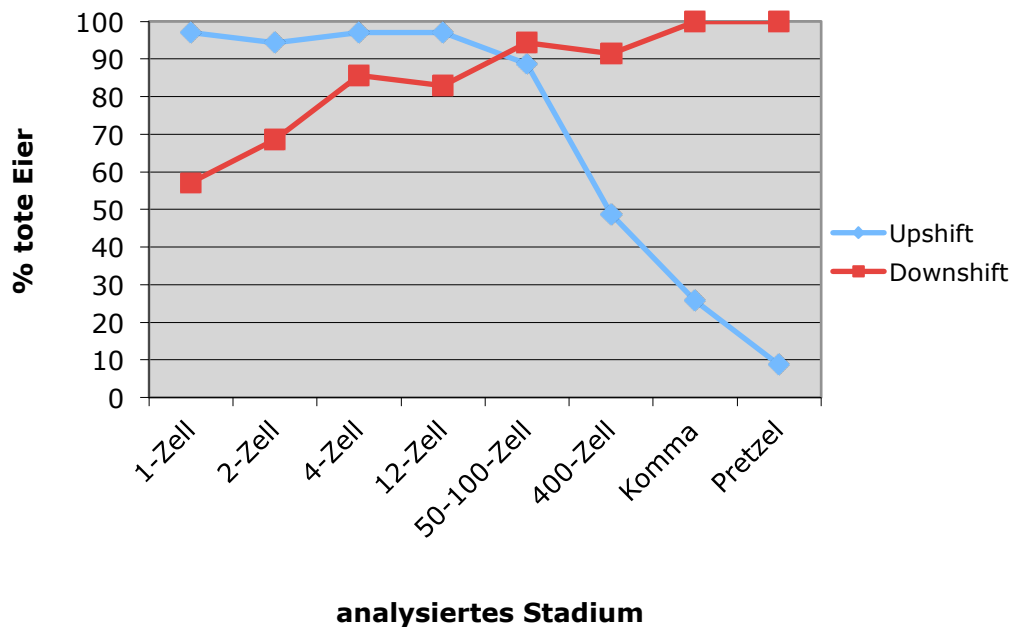
Da *let-19(t3219)* für eine Untereinheit des Mediatorkomplexes codiert, der zwischen Polymerase II und Transkriptionsfaktoren vermittelt, ist ein zusätzlicher zygotischer Effekt wahrscheinlich.

### Analyse der embryonalen temperatursensitiven Phase

Für eine weitere Analyse der Mutation in *let-19(t3219)* ist es von großem Interesse zu wissen, wann das Genprodukt in der Entwicklung benötigt wird. Da *let-19(t3219)* eine temperatursensitive Mutante ist, lässt sich das zu untersuchende Genprodukt jederzeit durch Wechsel von permissiver und restriktiver Temperatur in- bzw. reaktivieren. Durch Temperaturwechsel zu verschiedenen Zeiten, lässt sich ermitteln, wann das Genprodukt benötigt wird. Je 35 Embryonen in den verschiedenen Entwicklungsstadien wurden im Zuge der Analyse von der permissiven auf die restriktive Temperatur gebracht (Upshift), bzw. von der restriktiven auf die permissive Temperatur (Downshift) gebracht. Nach 48 h wurde überprüft, wie viele Embryonen sich entwickelt haben und geschlüpft sind. Eine graphische Darstellung erleichtert die Auswertung (Abb. 22). Die temperatursensitive Phase beginnt, wenn der Anteil toter Eier im Downshift über 50% steigt. Das Ende wird definiert, mit dem Zeitpunkt an dem der Anteil toter Eier im Zuge des Upshiftes unter 50% fällt.

Das Genprodukt scheint von Beginn der Entwicklung bis zum 400-Zellstadium benötigt zu werden. Es fällt auf, dass mit 40% nur wenig Ein-Zell-Embryonen den Downshift überleben. Es ist denkbar, dass das Genprodukt nicht vollständig renaturieren kann, wenn es einmal defekt vorliegt oder das denaturierte Genprodukt wichtige Bindungsstellen besetzt. Es ließe sich nun spekulieren, dass sich

denaturiertes LET-19 an die CDK-Domäne bindet, aber nicht mit dem Mediatorkomplex interagieren kann. Aufgrund dieser kompetitiven Hemmung kann intaktes LET-19 nicht mehr binden und die Embryonen sterben in der Entwicklung.



**Abb. 22: Embryonale temperatursensitive Phase von *let-19(t3219)*.** Auf der Ordinate sind die einzelnen untersuchten Stadien der Embryogenese aufgetragen. Der prozentuale Anteil der toten Eier ist auf der Abszisse aufgetragen. Die blaue Kurve zeigt den Wechsel von permissiver auf restriktive Temperatur (Upshift) und die rote Kurve zeigt den Wechsel von restriktiver auf permissive Temperatur (Downshift). Die Kurven schneiden sich auf Höhe des 50-100-Zellstadiums. Das Genprodukt scheint von Beginn der Entwicklung bis zum 400-Zeller benötigt zu werden.

Da *let-19(t3219)* für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der verschiedene Genexpressionen in der Embryogenese steuert (Wang *et al.*, 2004), wäre eine temperatursensitive Phase, die sich über die komplette Embryogenese erstreckt, wahrscheinlich. Da temperatursensitive Mutationen bei der restriktiven Temperatur aber oft noch eine gewisse Restaktivität zeigen, wäre es denkbar, dass zum Zeitpunkt des 400-Zellstadiums genügend funktionsfähiges Genprodukt vorliegt, um einen Großteil der Embryonen überleben zu lassen.

### Kontrolle der Zellschicksale mittels SIMI° Biocell

Mit der Software SIMI° Biocell lässt sich die Embryogenese von *C. elegans* verfolgen und analysieren. Die Entwicklung von fünf Embryonen der Mutante *let-19(t3219)*

wurde bei der restriktiven Temperatur aufgenommen und analysiert. Als terminale Phänotypen traten immer ungeordnete Zellanhäufungen auf (Abb. 16). Für eine Kontrolle der Zellschicksale wurden ausgesuchte Zellen, wie unter anderem die Zelltode, Hypodermiszellen und Darmzellen bis zu ihrem Entwicklungsende verfolgt. In Tabelle 7 sind die jeweiligen Schicksale aufgeführt.

**Tabelle 7: Überprüfung prägnanter Zellschicksale in fünf Embryonen von *let-19(t3219)* auf restriktiver Temperatur mittels SIMI<sup>o</sup> Biocell**

	<i>t3219_1</i>	<i>t3219_2</i>	<i>t3219_3</i>	<i>t3219_4</i>	<i>t3219_5</i>
CD # 1	+	fehlt	+	+	+
CD # 2	+	+	+	+	+
CD # 3	+	fehlt	fehlt	fehlt	+
CD # 4	+	+	+	+	+
CD # 5	+	+	fehlt	+	+
CD # 6	+	+	+	+	+
CD # 7	+	+	+	+	fehlt
CD # 8	+	+	+	fehlt	fehlt
CD # 9	Teilung	fehlt	Teilung	Teilung	fehlt
CD # 10	+	fehlt	+	+	+
CD # 11	+	+	+	+	+
CD # 12	fehlt	+	fehlt	+	fehlt
CD # 13	fehlt	+	+	+	fehlt
CD MS	fehlt	fehlt	+	fehlt	+
Exkret. Zelle	+	+	+	+	+
V1L	+	+	+	+	+
V2L	+	+	+	+	+
V4L	+	+	+	+	+
V6L	+	+	+	+	+
V1R	+	+	+	+	+
V2R	+	+	+	+	+
V4R	+	+	+	+	+
V6R	+	+	+	+	+
H2R	+	+	+	+	+
H2L	+	+	+	+	+

G2	+	+	+	+	+
TL	+	+	+	+	+
TR	+	+	+	+	+
Eplpa	Teilung	Teilung	+	+	+
Eplaa	Teilung	+	+	+	+
Eprppp	+	Teilung	+	+	+
Capaaa	+	+	+	+	+
Z2	+	+	+	+	+

Der Großteil der Zellen besaß ein korrektes Zellschicksal. In jedem analysierten Embryo fehlten zwar einige Zelltode, aber da sich hier innerhalb der Mutanten kein Muster zeigte und keine zusätzlichen Zelltode auftraten, wird dieser Fakt vernachlässigt. Vermutlich ist die Entwicklung zu diesem Zeitpunkt schon so gestört, dass die Zellen nicht mehr in die Apoptose eintreten. In zwei Embryonen teilten sich Zellen des Darms zusätzlich. Dieses Phänomen soll unter anderem mittels einer immunhistochemischen Analyse der Gewebedifferenzierung weiter untersucht werden.

Im Zuge der Zelllinienanalyse mit SIMI°Biocell wurden die Positionen der einzelnen Zellen in Koordinatenform aufgezeichnet. Das Programm kann nun für jeden Embryo verschiedenen 3D-Repräsentationen berechnen.

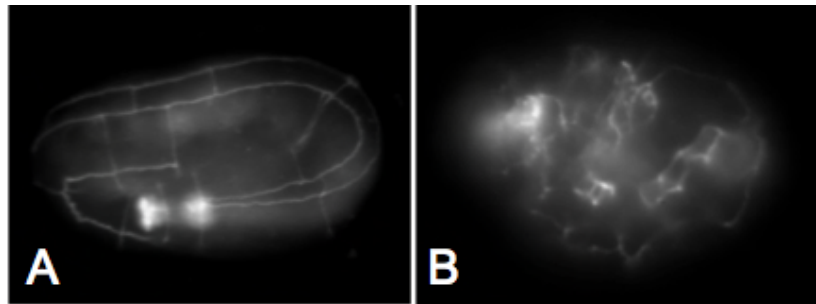
### Immunhistochemische Analyse der Gewebedifferenzierung

In den 4D-Aufnahmen bei restriktiver Temperatur zeigte *let-19(t3219)* einen ungeordneten terminalen Phänotyp. Die Embryonen starben als unförmige Masse und begannen nicht die Elongation. Zu Überprüfung der Gewebedifferenzierung wurden Embryonen von *let-19(t3219)* mit verschiedenen spezifischen Antikörpern gefärbt. So lassen sich die Ausbildungen verschiedener Gewebe, wie z.B. Muskel oder Pharynx, analysieren und deren Integrität überprüfen.

### **Epidermale Differenzierung**

Mittels des Antikörpers MH27 wurden die Desmosomen angefärbt. Diese Färbung gibt Aufschluss über die Organisation von Hypodermis-, Pharynx- und Darmzellen in der Embryogenese. Im Wildtyp erkannte man deutlich die Hypodermiszellen und Zellen des Pharynx (Abb. 22 A). In der Mutante lagen die Zellen bei restriktiver

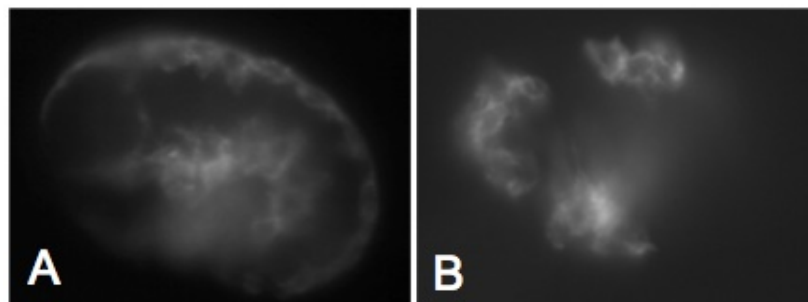
Temperatur ohne jegliche Ordnung im Embryo verteilt und bildeten keine typische Hypodermis (Abb. 22 B). Dies entspricht den Ergebnissen der Zelllinienanalyse.



**Abb. 22: Immunhistochemische Färbung der Desmosomen** (A) Im Wildtyp lässt sich deutlich die Struktur der Hypodermis erkennen. (B) In der Mutante *let-19(t3219)* sind die Zellen bei restriktiver Temperatur ohne jegliche Struktur im Embryo verteilt.

### Differenzierung des Körpermuskels

Die 81 Körpermuskel-Zellen in *C. elegans* lassen sich mit dem Antikörper 5-6 detektieren. Im Wildtyp ließen sich deutlich die typischen Strukturen des Muskels erkennen (Abb. 23 A). Im Vergleich dazu lagen die Muskelzellen der Mutante unorganisiert im Embryo (Abb. 23 B). Durch Auszählen ( $n = 10$ ) ergab sich ein Wert von  $79 \pm 2$  Muskelzellen in der Mutante. Dies entspricht der Zellzahl im Wildtyp. Damit werden die Erkenntnisse der Zelllinienanalyse bestätigt.

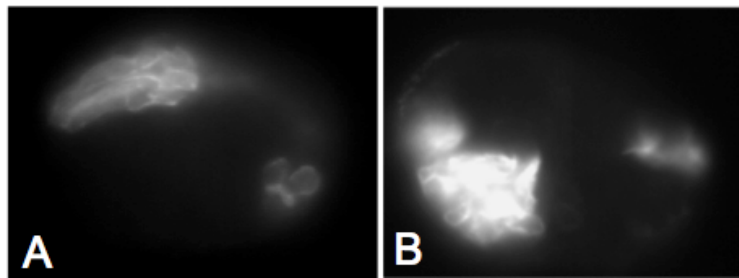


**Abb. 23: Immunhistochemische Färbung des Körpermuskels** (A) Im Wildtyp sind die 81 Körpermuskelzellen gefärbt. (B) In der Mutante *let-19(t3219)* sind die Zellen bei restriktiver Temperatur ungeordnet.

### Differenzierung der Pharynxstruktur

Der Antikörper 3NB12 bindet spezifisch an die Glykoproteine des Pharynx. In einem Wildtyp färbten 21 Pharynxzellen und vier Neuronen (Abb. 24 A). Man erkannte deutlich die typische Struktur des Pharynx. In der Mutante *let-19(t3219)* befanden sich die gefärbten Zellen unorganisiert und strukturlos im mittleren Bereich des

Embryos (Abb. 24 B). Ein Pharynx ließ sich hier nicht erkennen. Es ließen sich  $20 \pm 2$  Zellen zählen ( $n=10$ ). Dies entspricht der Zellzahl im Wildtyp.

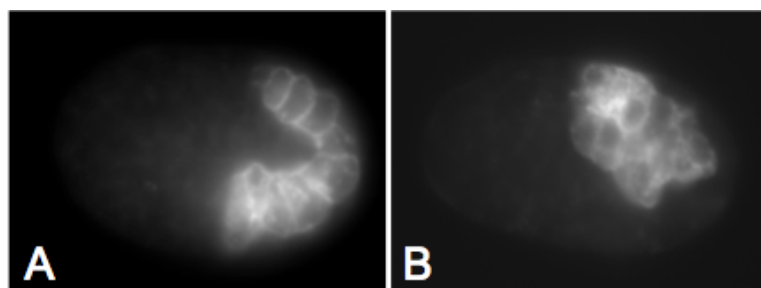


**Abb. 24: Immunhistochemische Färbung der Pharynxstruktur** (A) Im Wildtyp war der Pharynx klar erkennbar. (B) Bei der restriktiven Temperatur bildete die Mutante *let-19(t3219)* keinen Pharynx aus.

### Darmdifferenzierung

Der Antikörper ICB4 detektiert die Darmzellen, sechs bis acht Neuronen und drei Drüsenzellen. Im Wildtyp färbte er insgesamt 20 Darmzellen und man erkannte deutlich die Struktur des Darms (Abb. 25 A). In der Mutante *let-19(t3219)* bildete sich der Darm nicht vollständig aus (Abb. 25 B). Es ließen sich  $20 \pm 1$  Zelle zählen ( $n=10$ ). Dies entspricht der Zellzahl im Wildtyp-Embryo.

In zwei der fünf durchgeführten Zelllinienanalysen wurden zusätzliche Teilungen einiger Darmzellen detektiert. Dies wurde weder in den anderen Embryonen noch in der immunhistochemischen Färbung beobachtet. Entweder sind diese zusätzlichen Teilungen so seltene Defekte, dass sie in der immunhistochemischen Färbung nicht beobachtet wurden oder ein Teil der zusätzlichen Zellen wird nicht von dem Antikörper detektiert.



**Abb.25: Immunhistochemische Färbung des Darms** (A) Im Wildtyp waren die Darmzellen deutlich gefärbt. (B) Bei der restriktiven Temperatur konnte die Mutante *let-19(t3219)* keinen intakten Darm ausbilden.



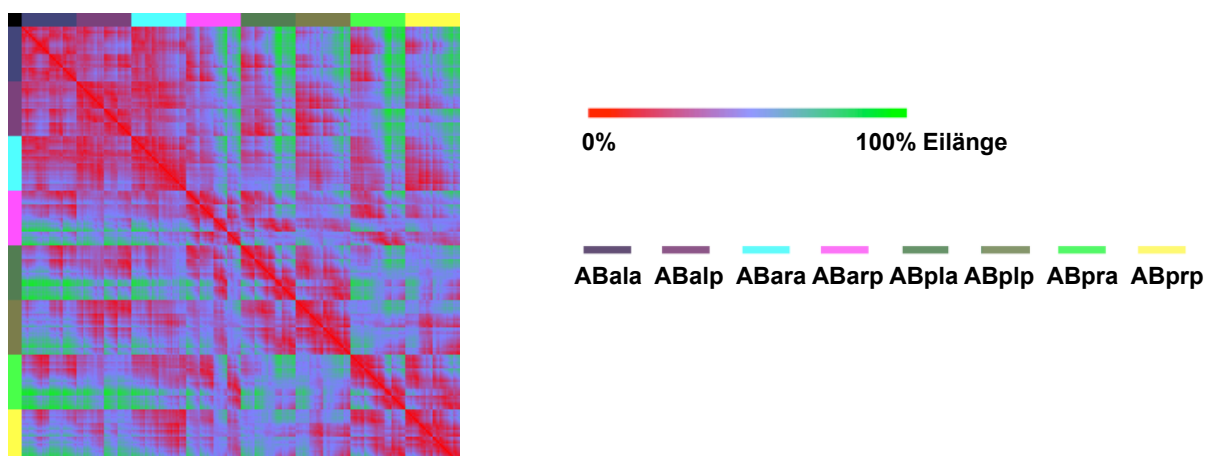
In jeder immunhistochemischen Färbung zeigte die Mutante *let-19(t3219)* ein strukturloses Chaos. Keines der gefärbten Gewebe bildete sich auch nur annähernd korrekt aus. Interessanterweise stimmte aber die Zahl der Zellen in den gefärbten Strukturen mit der korrespondierenden Zahl im Wildtyp überein. Dies spricht für eine korrekte Verteilung der Schicksale und einen Defekt in der Zellmigration und bestätigt die Ergebnisse der Zelllinienanalyse. Somit ist *let-19(t3219)* ein Kandidat für eine Zellfokussierungsmutante.

## Bioinformatische Analyse von *let-19(t3219)*

Mit dem Programm Phainothea, das von Christian Hennig und Ralf Schnabel entwickelt wurde, lassen sich die Daten von SIMI° Biocell bioinformatisch auswerten. Aus den gespeicherten Zellkoordinaten werden verschiedene Karten erstellt, die die Position der einzelnen Zellen im Embryo graphisch darstellen. Komplexe Zusammenhänge werden so oft anschaulich dargestellt.

### Visualisierung der Zellpositionen mit Distanzkarten

Durch die Visualisierung mittels Distanzkarten lassen sich Positionsdefekte klar und schnell erkennen.

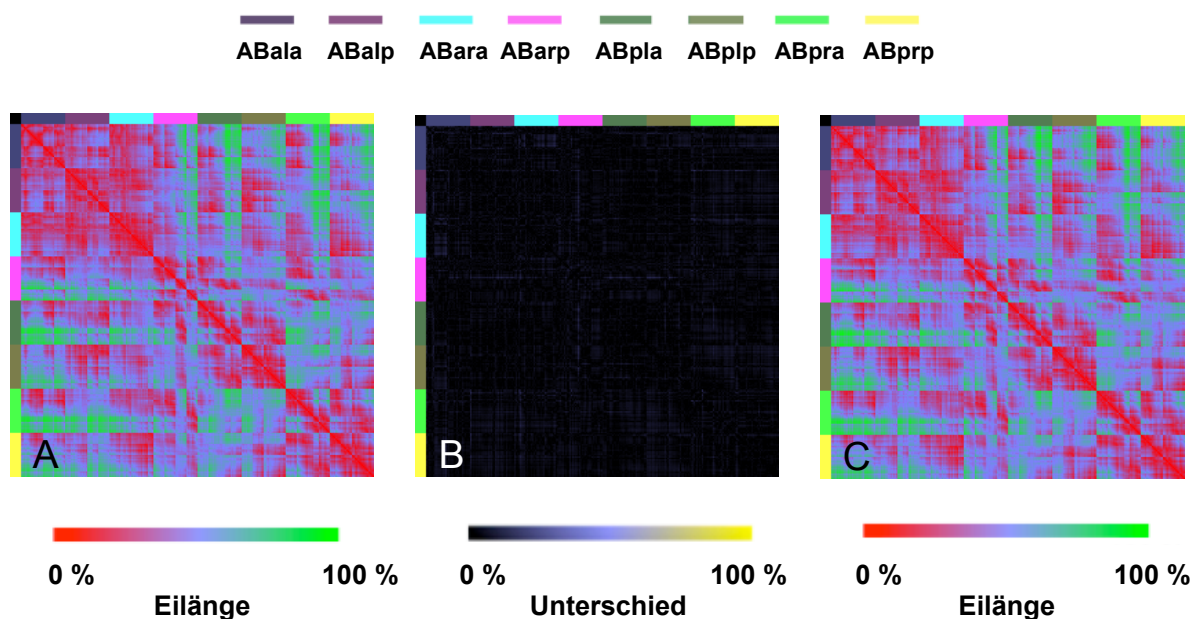


**Abb.26: Distanzkarte des Consensus-Wildtyp-Embryos.** Die Distanzkarte stellt die Entfernung einzelner Zellen farblich dar. Die einzelnen Regionen werden sowohl horizontal als auch vertikal von der anteriorsten bis zur posteriorsten Position aufgetragen. Der jeweilige Abstand zwischen zwei Zellen wird dann im aufgeführten Farbcode visualisiert.

Um eine aussagekräftige Referenz zu bekommen, wurden die Daten von fünf analysierten Wildtyp-Embryonen nach der neunten Zellteilungsrunde in einem Consensus vereinigt und daraus eine Distanzkarte errechnet (Abb. 26). Als Darstellungsform wird hierbei eine Matrix aus den Positionswerten der einzelnen Zellen aus der AB-Zelllinie gewählt. Dabei sind die einzelnen Regionen horizontal und vertikal von der anteriorsten bis zur posteriorsten Position aufgeführt. Der Abstand zwischen den Zellen wird mittels eines RGB-Farbcodes dargestellt. Sehr kurze Distanzen werden rot eingefärbt, mittlere Distanzen erscheinen blau und weite Distanzen werden grün markiert.

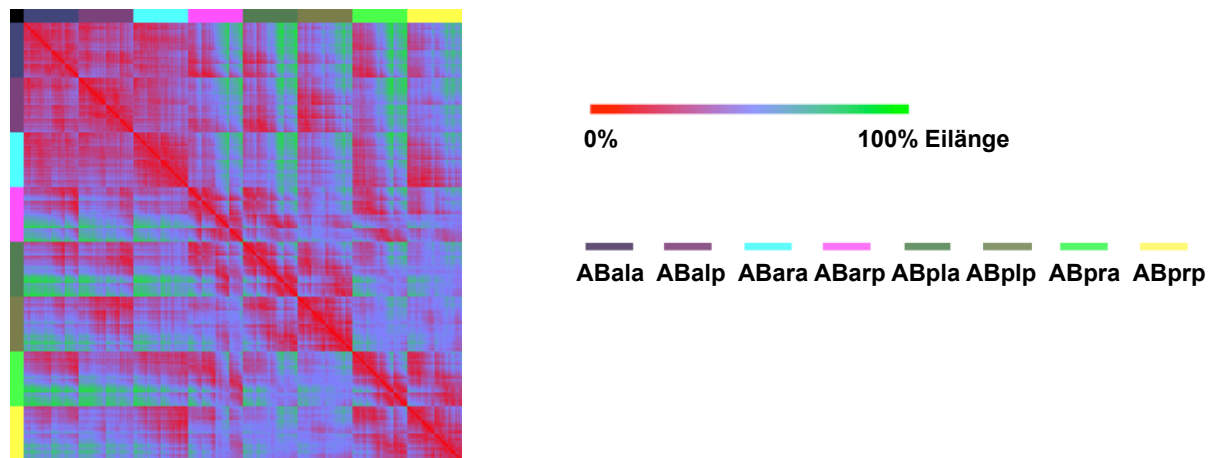
Unterschiede in zwei Distanzkarten verschiedener Embryonen – und damit Unterschiede in ihrer Zellpositionierung – erkennt man deutlich, indem man die Distanzkarten voneinander abzieht. So ergibt sich als Differenz aus den zwei RGB-Werten ein neuer Wert für diese Position, der in eine **Differenzkarte** eingefügt wird. Wenn zwei RGB-Farbwerte identisch sind, ergibt sich als Differenz für alle drei Farbteile null – dies wird im RGB-Code schwarz dargestellt. Je größer die Differenz ist, umso heller wird die resultierende Farbe.

Die Differenzkarte zweier Wildtypen erscheint sehr dunkel. Die Zellpositionierung beider Embryonen ist fast identisch (Abb. 27).



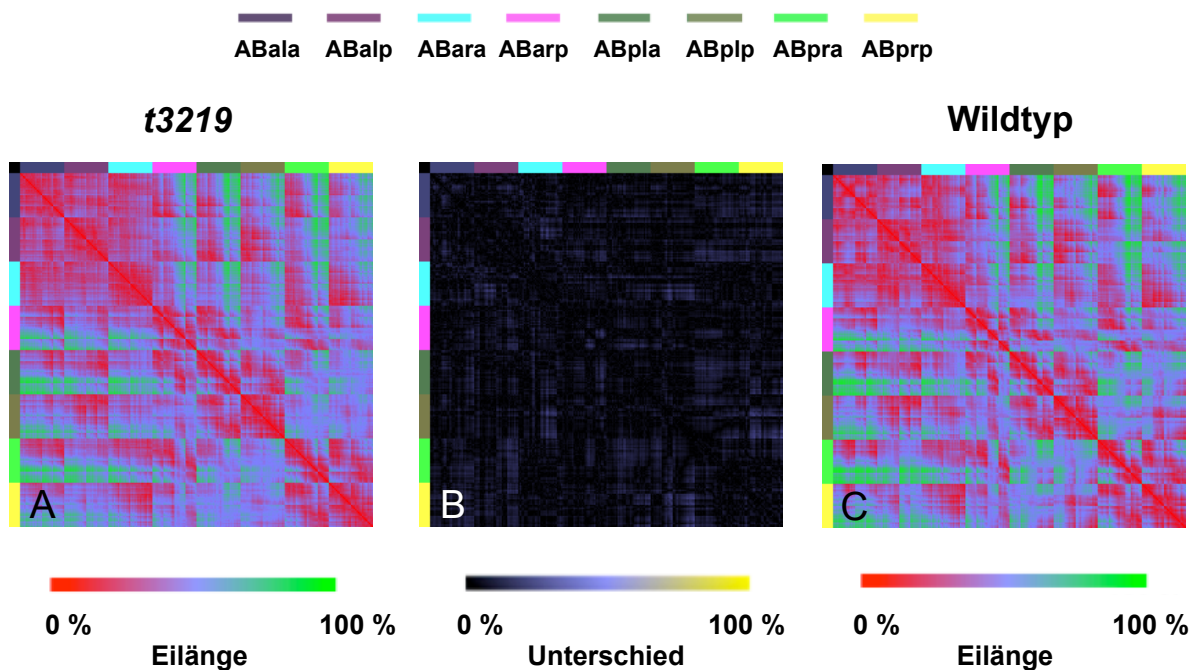
**Abb. 27: Die Differenzkarte zweier Embryonen ist sehr dunkel, wenn ihre Zellpositionierung sehr ähnlich ist.** (A) Distanzkarte eines Wildtyp-Embryos (,IBRS'). (B) Differenzkarte der Embryonen ,IBRS' und ,Embryo 5'. Die dunkle Färbung zeigt, wie ähnlich sich beide Embryonen sind. (C) Distanzkarte eines Wildtyp-Embryos (,Embryo 5')

Aus den fünf analysierten *let-19(t3219)*-Embryonen wurde ebenfalls eine Distanzkarte gebildet (Abb. 28).



**Abb. 28: Distanzkarte des Consensus-*t3219*-Embryos.** Die Distanzkarte stellt die Entfernung einzelner Zellen farblich dar. Die einzelnen Regionen werden sowohl horizontal als auch vertikal von der anteriorsten bis zur posteriorsten Position aufgetragen. Der jeweilige Abstand zwischen zwei Zellen wird dann im aufgeführten Farbcode visualisiert.

Um nun die Mutante *let-19(t3219)* mit dem Wildtyp zu vergleichen, wird aus den Distanzkarten eine Differenzkarte gebildet (Abb. 29).



**Abb. 29: Die Differenzkarte von *let-19(t3219)* und dem Wildtyp.** (A) Distanzkarte des *t3219*-Consensus-Embryos (B) Differenzkarte der Consensus-Embryonen von *let-19(t3219)* und Wildtyp. Es sind Unterschiede in der Zellpositionierung der Embryonen erkennbar. (C) Distanzkarte des Wildtyp-Consensus-Embryos

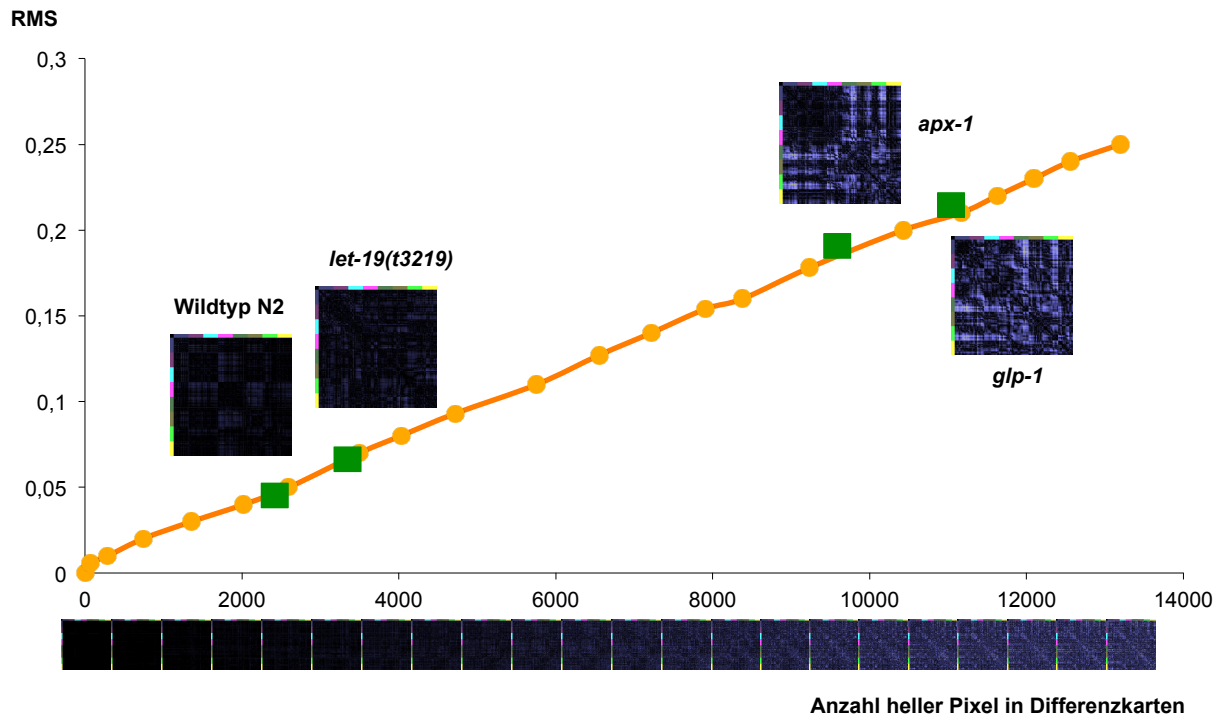
In der Differenzkarte sieht man einige helle Bereiche. Die Zellposition in den *let-19(t3219)*-Embryonen weicht in einigen Bereichen von der Zellposition im Wildtyp ab. Die stärksten Unterschiede findet man im posterioren Bereich.

Eine weitere Möglichkeit Unordnung in Embryonen zu berechnen, ist der RMS-Wert. Cohen und Sternberg berechneten mittels der ‚root means square‘-Funktion den mittleren Unterschied gepaarter Zahlenreihen (Cohen & Sternberg, 1980). In dieser Arbeit wird der RMS-Wert dazu genutzt, die mittlere Abweichung aller Zell-Zell-Distanzen zu ermitteln.

Die Kombination des RMS mit den Differenzkarten gibt ein aussagekräftiges Bild von der Unordnung, die in einem Embryo herrscht. Der Zusammenhang zwischen RMS und der Helligkeit der Differenzkarten lässt sich graphisch darstellen (Abb. 30). Verschiedene Wildtypen sind sich untereinander sehr ähnlich. Differenzkarten sind sehr dunkel und haben nur wenig helle Pixel. Nach der neunten Zellteilungsrunde gibt es 256 AB-Zellen und somit 65536 Pixel in den Differenzkarten. Vergleicht man Wildtypen untereinander haben sie ca. 2200 helle Pixel in der Karte. Das ergibt ungefähr einen RMS-Wert von 0,05.

Die Mutanten *glp-1* und *apx-1* haben einen starken Schicksalsdefekt (Hutter & Schnabel, 1994). Da sich die Zellen ihrem falschen Schicksal entsprechend anordnen, ergibt sich eine deutlich falsche Positionierung der Zellen. Die Differenzkarte von *apx-1* zum Wildtyp hat deutlich sichtbare helle Bereiche - knapp 10.000 Pixel in der Differenzkarte haben eine helle Färbung. Der RMS liegt bei ca. 0,18. *glp-1* weist sogar noch mehr hellere Pixel in der Differenzkarte auf und der RMS liegt bei 0,2.

*let-19(t3219)* ordnet sich zwischen diesen Extremen an. In der Differenzkarte sind etwas über 3500 helle Pixel erkennbar und der RMS liegt ungefähr bei 0,07. Der Vergleich zeigt, dass *let-19(t3219)* einen eher moderaten Defekt in der Zellpositionierung hat.



**Abb. 30: Zusammenhang von RMS-Wert und Differenzkarten.** Auf der Ordinate ist die Anzahl heller Pixel in Differenzkarten aufgetragen. Der RMS-Wert ist auf der Abszisse dargestellt. Vergleicht man Wildtyp-Embryonen miteinander, ist die resultierende Differenzkarte sehr dunkel und der RMS liegt bei 0,05. Schicksalsmutanten wie *glp-1* und *apx-1* haben deutlich mehr helle Pixel in Differenzkarten und RMS-Werte von ungefähr 0,2. *let-19(t3219)* liegt dazwischen mit ca 3500 hellen Pixeln und einem RMS von ungefähr 0,07.

Für den errechneten Consensus-Embryo von *let-19(t3219)* wurden die Daten von fünf analysierten Embryonen vereinigt. Dabei stellte sich raus, dass auch innerhalb der Mutanten Unterschiede in der Zellpositionierung vorlagen. Als erste Analyse wurden sowohl die einzelnen RMS-Werte der Embryonen untereinander gebildet als auch die RMS-Werte gegen den Wildtyp-Consensus (Tab. 8).

**Tabelle 8: Vergleich von verschiedenen t3219-Embryonen mittels RMS-Wert**

	t3219_1	t3219_2	t3219_3	t3219_4	t3219_5	Consensus_N2
t3219_1	0	0,100	0,100	0,100	0,100	0,110
t3219_2	0,100	0	0,093	0,095	0,106	0,100
t3219_3	0,100	0,093	0	0,079	0,085	0,083
t3219_4	0,100	0,095	0,079	0	0,085	0,074
t3219_5	0,100	0,106	0,085	0,085	0	0,080

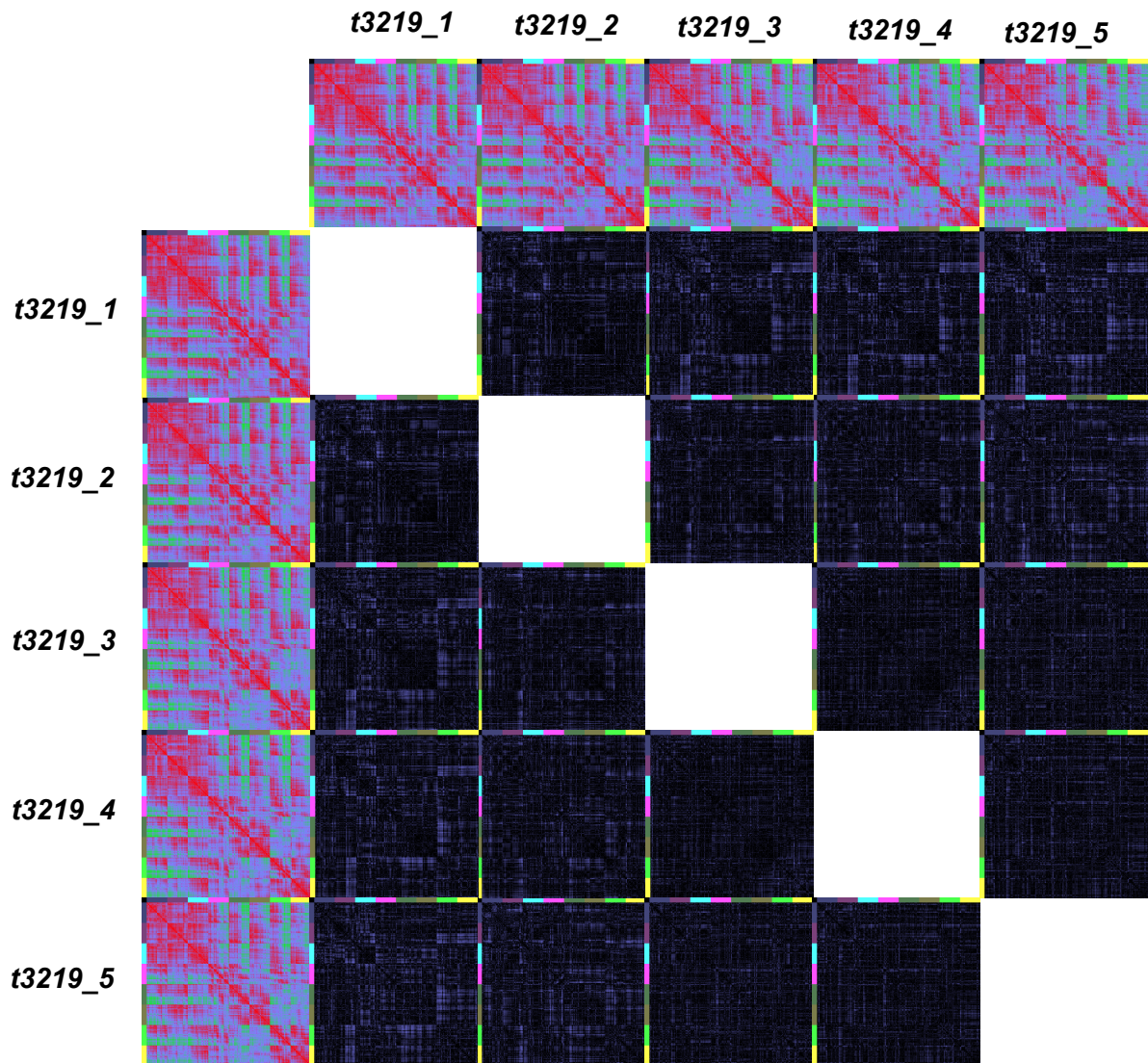
Die RMS-Werte innerhalb der Embryonen von *let-19(t3219)* bewegen sich zwischen 0,079 – 0,106. Vergleicht man die Embryonen mit dem Wildtyp-Consensus, erhält man RMS-Werte von 0,074 – 0,110. Die einzelnen mutanten Embryonen sind folglich untereinander genauso unterschiedlich wie gegen den Wildtyp. Dies zeigt, dass sich die Zellen in *let-19(t3219)* ohne Richtung und System falsch anordnen. Die Zellen in jedem Embryo wären individuell falsch sortiert.

Da der Consensus aus fünf *let-19(t3219)* – Embryonen verglichen mit dem Wildtyp-Consensus einen niedrigen RMS-Wert von 0,068 hat, scheinen sich die Fehler in der Zellpositionierung innerhalb der *t3219*-Embryonen auszugleichen. Dies wäre ebenfalls der Fall, wenn sich die Zellen in jedem Embryo unabhängig falsch sortieren.

Um die Unterschiede zwischen den analysierten Embryonen von *let-19(t3219)* zu visualisieren, werden aus den einzelnen Distanzkarten Differenzkarten ermittelt (Abb. 31). Die verschiedenen Differenzkarten von *t3219\_1* weisen deutlich helle Bereiche auf. Die Bereiche ABpra (hellgrün) und ABprp (gelb) fallen dabei besonders auf. Auch *t3219\_2* hat in seinen Differenzkarten helle Bereiche. Diese sind zwar nicht so ausgeprägt wie bei *t3219\_1*, aber doch gut erkennbar. Insgesamt lassen sich die hellen Pixel hier weniger deutlich den einzelnen Regionen zuordnen, aber man erkennt auch hier eine Häufung der hellen Pixel in den Bereichen ABpra (hellgrün) und ABprp (gelb). Die Embryonen *t3219\_3*, *t3219\_4* und *t3219\_5* scheinen sich sehr ähnlich in Bezug auf die Zellpositionierung zu sein. Die resultierenden Differenzkarten sind sehr dunkel. Bereiche mit stärkerer Helligkeit sind nicht auszumachen.

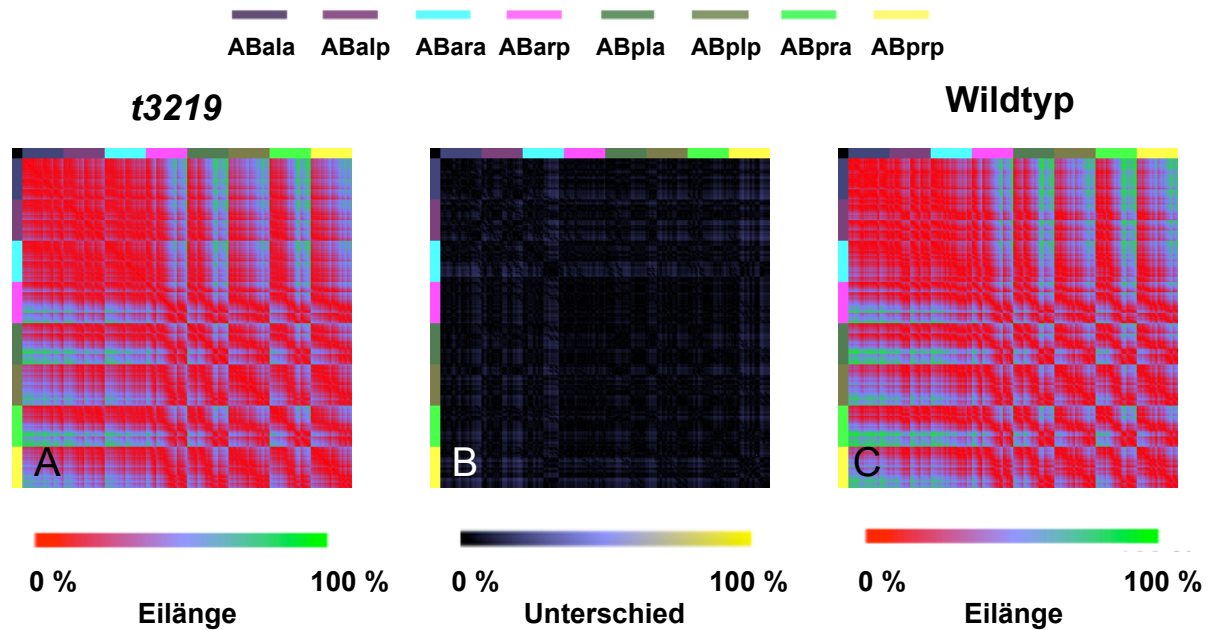
Diese Ergebnisse stimmen mit den RMS-Werten aus der Tabelle überein. Die Embryonen unterscheiden sich in unterschiedlichem Maße innerhalb ihrer Zellpositionierung voneinander. Zwei der Embryonen haben stärkere Abweichungen in ihrer Zellsortierung. Der Phänotyp scheint sich unterschiedlich schwer auszuprägen. Möglicherweise hat das mutante Protein LET-19 noch Restaktivität und kann teilweise beim Prozess der Zellsortierung eingreifen.





**Abb. 31: Aus den Distanzkarten der fünf analysierten Embryonen von *let-19(t3219)* werden Differenzkarten gebildet.** Die Embryonen *t3219\_1* und *t3219\_2* heben sich relativ stark von den anderen Embryonen ab. Die Differenzkarten der Embryonen *t3219\_3*, *t3219\_4* und *t3219\_5* sind sehr dunkel. Die Embryonen ähneln sich stark in ihrer Zellpositionierung.

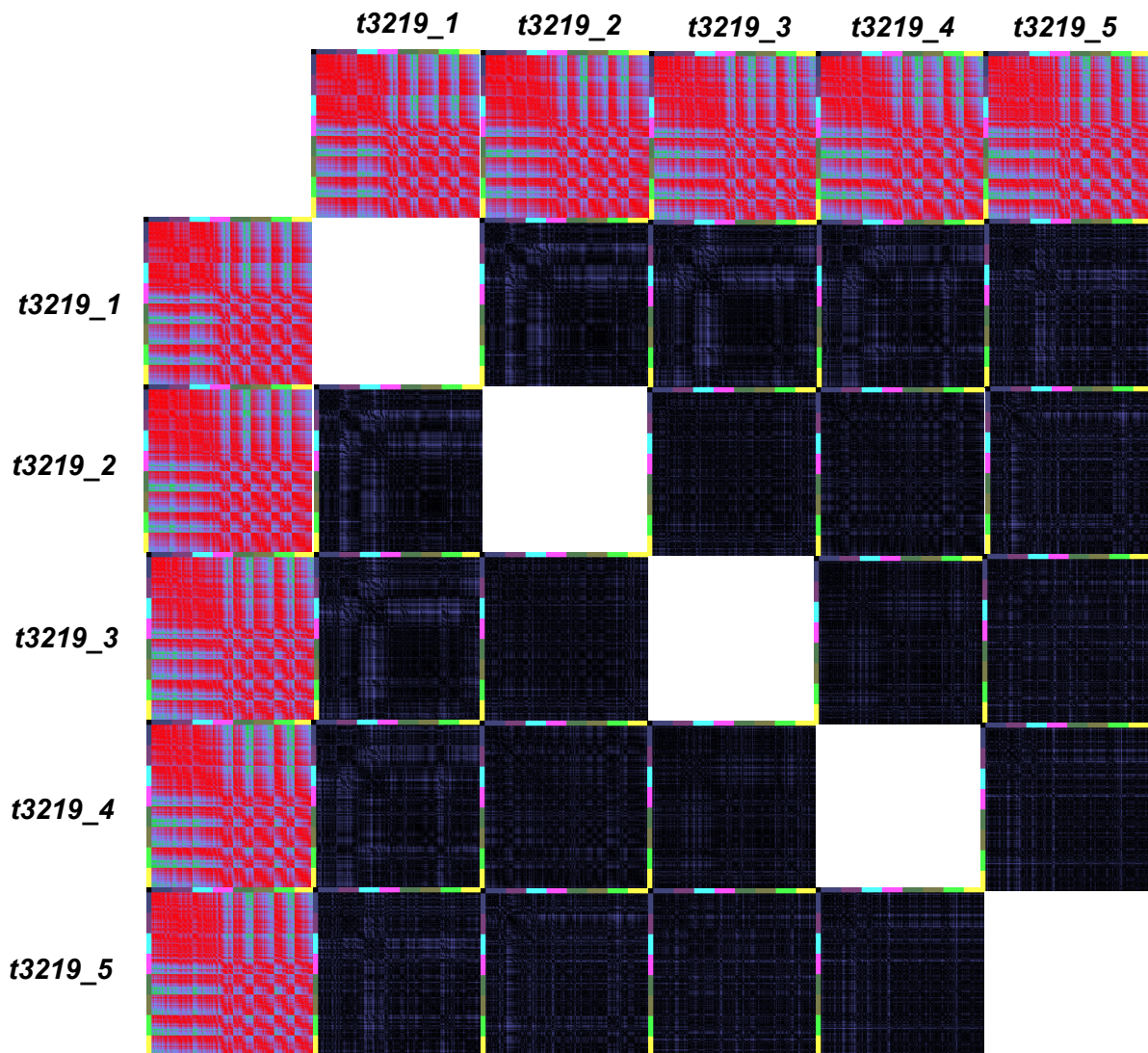
Es lassen sich auch Distanzkarten bilden, in denen nur die x-Koordinate der Positionswerte betrachtet wird. So lassen sich Verschiebungen auf der Anterior-Posterior-Achse besonders deutlich darstellen. Bildet man solch eine Differenzkarte aus den Distanzkarten der Consensus-Embryonen von *let-19(t3219)* und dem Wildtyp fallen deutlich hellere Bereiche in ABara (hellblau) und den posterioren Zellen von ABala (blau) und ABalp (violett) auf (Abb. 32). Die Zellen scheinen sich in bestimmten Bereichen des Embryos falsch auf der Anterior-Posterior-Achse anzuordnen



**Abb.32: Vergleich der Zellpositionierung innerhalb der Anterior-Posterior-Achse zwischen *let-19(t3219)* dem Wildtyp.** (A) Distanzkarte des Consensus-Embryos von *let-19(t3219)*. Es wurden nur die Positionswerte auf der X-Achse berechnet. (B) Differenzkarte der Consensus-Embryonen. Man erkennt deutlich hellere Bereiche in ABala, ABalp und ABara. (C) Distanzkarte des Consensus-Embryos des Wildtyps. Es wurden nur die Positionswerte der x-Achse betrachtet.

Um zu analysieren, ob diese Fehlsortierung innerhalb der Anterior-Posterior-Achse in allen untersuchten *let-19(t3219)*-Embryonen auftritt, werden die einzelnen Distanzkarten untereinander verglichen (Abb. 33). Der Embryo *t3219\_1* hat wieder die stärksten hellen Bereiche in den Differenzkarten. Er unterscheidet sich von den anderen Embryonen vor allem in der Anterior-Posterior-Positionierung der ABala- (dunkelblau), ABalp- (violett) und ABara-Zellen (hellblau). Die Embryonen *t3219\_2* und *t3219\_3* ähneln sich. Vergleicht man sie jedoch mit den anderen Embryonen, bemerkt man Abweichungen in der Anterior-Posterior-Positionierung der Zellen. In allen Bereichen der AB-Zelllinie kommen Positionsunterschiede vor, allerdings findet man sie wieder verstärkt in den Bereichen ABarp (violett) und ABara (hellblau). Abschließend lassen sich noch *t3219\_4* und *t3219\_5* miteinander vergleichen. Hier sind wieder einzelne Zellen anders positioniert. Es scheint vor allem starke Unterschiede in der Anterior-Posterior-Positionierung zwischen den Zellen im anterioren Bereich wie ABala (dunkelblau) und ABalp (violett) zu den langgestreckten Regionen wie ABarp (pink) oder ABpra (hellgrün) zu geben.



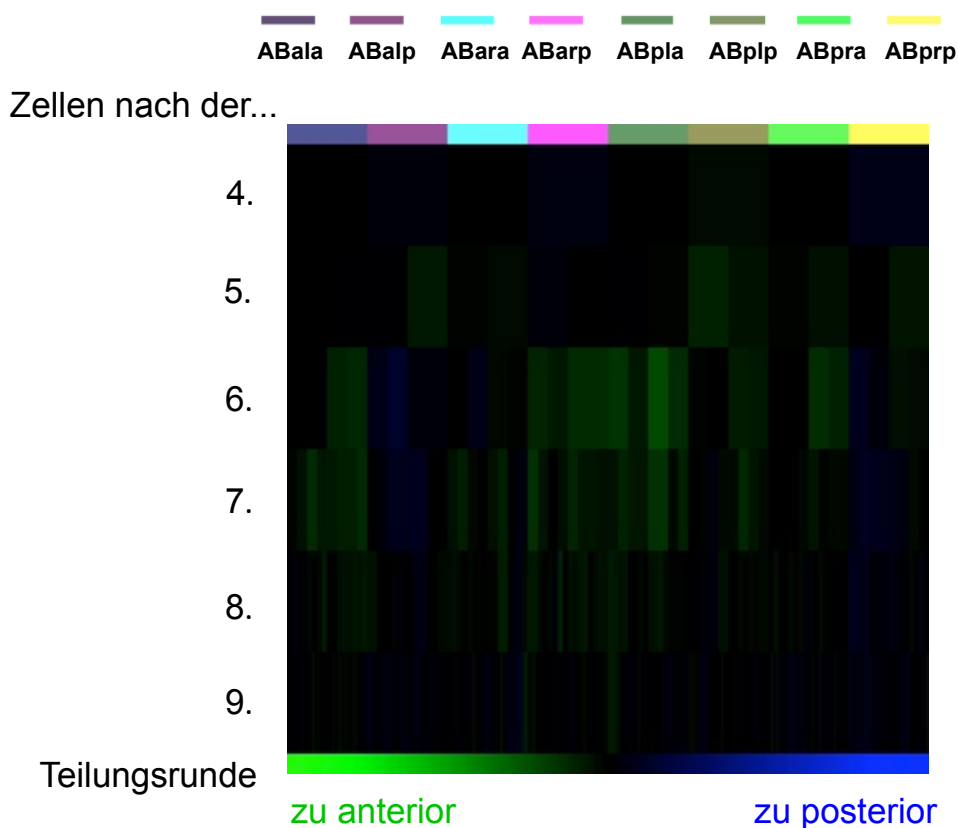


**Abb. 33: Vergleich der Anterior-Posterior-Positionierung der Zellen in den analysierten *let-19(t3219)*-Embryonen mittels Differenzkarten.** Der Embryo *t3219\_1* unterscheidet sich deutlich von den anderen Embryonen. Vergleicht man *t3219\_2*, *t3219\_3*, *t3219\_4* und *t3219\_5* bemerkt vereinzelte Positionsunterschiede.

Innerhalb der Positionierung der Zellen auf der Anterior-Posterior-Achse ähneln sich die Embryonen von *let-19(t3219)*. Allerdings treten gehäuft Fehlpositionen in den Regionen ABalp (violett) und ABara (hellblau) auf. Diese sind deutlich als helles Kreuz im oberen linken Teil der Differenzkarten zu erkennen. Die Positionsfehler, die sich in Abb. 32 teilweise in den Regionen ABpra (hellgrün) und ABprp (gelb) zeigten, sind hier nicht mehr vorhanden. Die Positionierungsfehler in diesen Regionen betreffen vermutlich die anderen Achsen des Embryos. Es ist davon auszugehen, dass *let-19(t3219)* einen Defekt in der Zellsortierung hat, allerdings scheinen die Zellen in jedem Embryo individuell falsch zu migrieren. Ein einheitliches Muster lässt sich bisher nicht erkennen.

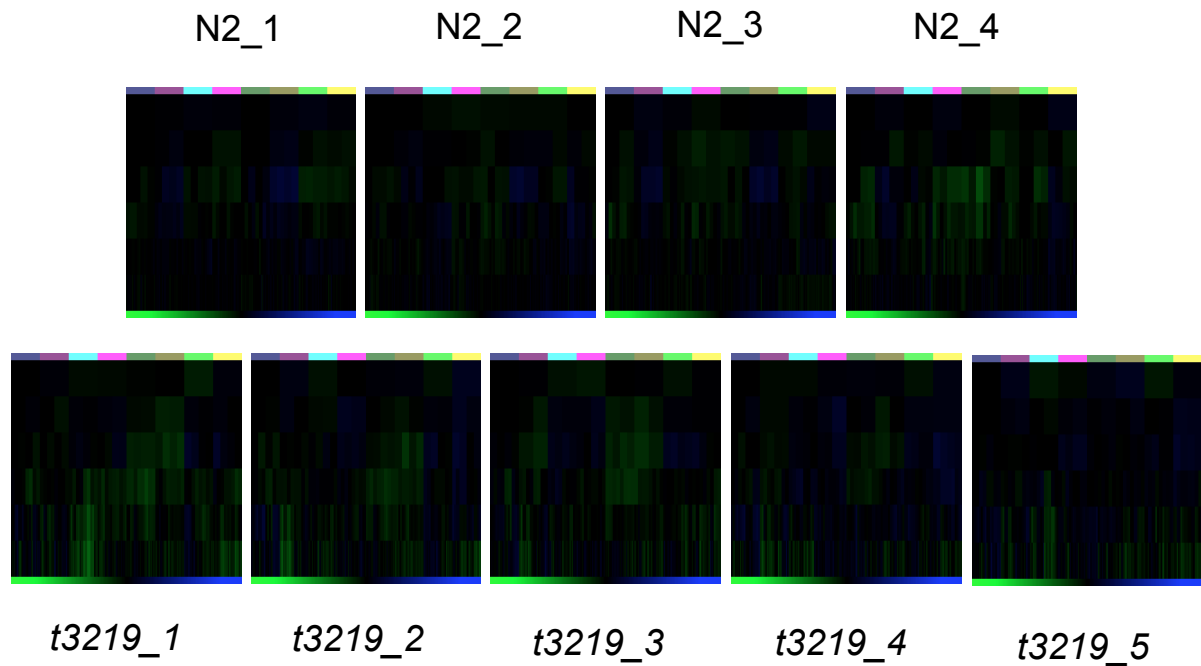
## Visualisierung der Zellbewegung mittels DDMs in *let-19(t3219)*

Die Bewegung der Zellen innerhalb der Embryogenese lässt sich graphisch in DDMs (Direct Distance Map) darstellen (Abb. 34). Hierbei werden vom Wildtyp abweichende Zellpositionierungen in anteriorer Richtung in verschiedenen Grüntönen und falsche Zellpositionierungen in posteriorer Richtung in Blautönen dargestellt. Vertikal sind die einzelnen Teilungsrunden aufgeführt. Horizontal werden die einzelnen Regionen aufgezeichnet. Je nach Teilungsrunde werden so acht, 16, 32, 64, 128 und 256 Zellen betrachtet.



**Abb. 34: DDM eines Wildtyp-Embryos.** Vertikal sind die einzelnen Teilungsrunden aufgeführt. Horizontal werden die einzelnen Regionen aufgezeichnet. Falsche Zellpositionierungen werden mit Grün- bzw. Blautönen markiert. Innerhalb der Entwicklung positionieren sich einige Zellen falsch, aber nach der achten Teilungsrunde scheint ein Sortierungsprozess zu beginnen.

Im Wildtyp variiert die Zellpositionierung während der Entwicklung. In der graphischen Darstellung werden die anders positionierten Zellen grün oder blau eingefärbt. Ab der achten Teilungsrunde scheint aber ein Sortierungsprozess zu starten, der die Zellen an ihre korrekte Position bringt.

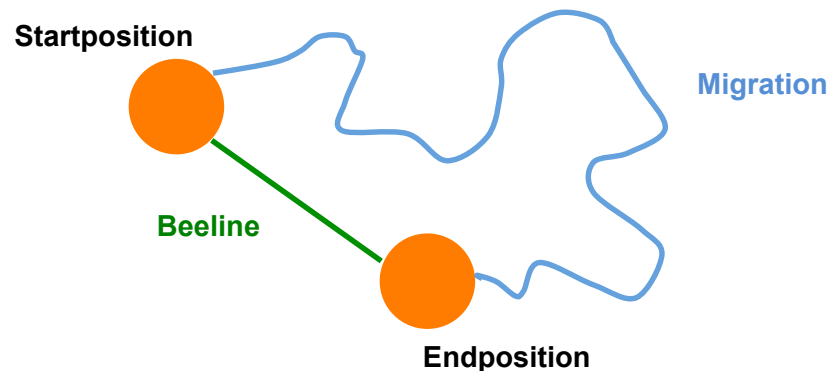


**Abb. 35: Vergleich des Wildtyps mit *let19(t3219)* anhand DDMs.** Im Wildtyp variieren die Zellpositionen zwar leicht innerhalb der Entwicklung, aber ab der achten Teilungsrunde scheint ein Sortierungsprozess zu greifen. In der Mutante sind schon früh Zellen falsch positioniert. Auch nach der neunten Teilungsrunde liegen noch Zellen am falschen Ort. Ein Sortierungsmechanismus scheint hier nicht oder nur ungenügend zu greifen.

Innerhalb der vier analysierten Wildtypen gibt es leichte Unterschiede in der Zellposition während der Entwicklung (Abb. 35). Gemeinsamkeiten lassen sich nicht erkennen. Ab der achten Teilungsrunde ist der Großteil der Zellen wieder korrekt angeordnet. Es scheint, dass die Zellpositionierung in der Entwicklung noch variabel ist, aber nach der achten und neunten Zellteilungsrunde eine Art globaler Sortierungsprozess eintritt. Die DDMs von den analysierten *let-19(t3219)*-Embryonen unterscheiden sich davon stark. Ab der fünften Zellteilungsrunde sind hier Zellen falsch positioniert. Es tritt auch später in der Entwicklung kein Ordnungsprozess ein. Nach der neunten Zellteilungsrunde sind die Zellen immer noch falsch positioniert. Es sind eher Verschiebungen im anterioren Bereich festzustellen. Es scheint, dass der Prozess der Zellsortierung hier nicht oder nur ungenügend greift.

## Analyse von Migration und zurückgelegter Luftlinie der Zellen in *let-19(t3219)*

Die Bewegung von Zellen setzt sich aus Bewegung durch Mitosen und den tatsächlich zurückgelegten Distanzen (= Migrationen) zusammen. Daraus ergibt sich die zurückgelegte Luftlinie (= Beelines) (Abb. 36).



**Abb. 36: Die Zellen legen in der Embryonalentwicklung Distanzen zurück.** Die Migration (hellblau) bezeichnet die tatsächlich zurückgelegte Distanz. Die Luftlinie wird mit der sogenannten Beeline (grün) angegeben.

In vier analysierten Wildtyp-Embryonen schwanken die durchschnittlichen Migrationen von 84,4 – 95,0 Prozent der Eilänge und die durchschnittlichen Beelines von 43,4 – 45,4 Prozent der Eilänge (Tab. 9). Für einen aussagekräftigen Vergleich bietet sich der Quotient aus Migration und Beeline an. Die vier Embryonen haben sehr ähnliche Werte von 1,9 bzw. 2,2. Man erkennt also, dass die Zellen längere Distanzen migrieren und nicht den direktesten Weg nehmen. Der durchschnittliche Quotient liegt bei 2,0. Innerhalb des Wildtyps gibt es einige Schwankungen, allerdings sind die Zellen im prämorphogenetischen Stadium doch an derselben Position. Dies entspricht den DDMs – innerhalb der Entwicklung ist die Zellposition recht variabel, aber nach der achten und neunten Teilungsrunde beginnen Sortierungsprozesse. In *let-19(t3219)* liegen die Migrationen durchschnittlich bei 89,7 – 130,5 Prozent der Eilänge und die Beelines durchschnittlich bei 43,4 – 52,9 Prozent der Eilänge. Daraus ergeben sich Quotienten von 2,1 - 2,5, wobei der Durchschnitt der untersuchten Embryonen bei 2,3 liegt. Die Zellen migrieren also etwas stärker bei ähnlichen Beelines. Die Zellen scheinen ihre korrekte Position zu suchen und wandern ziellos durch den Embryo.

**Tabelle 9: Vergleich der durchschnittlichen Migrationen und Beelines in Wildtyp und *let-19(t3219)* in Prozent der Eilänge**

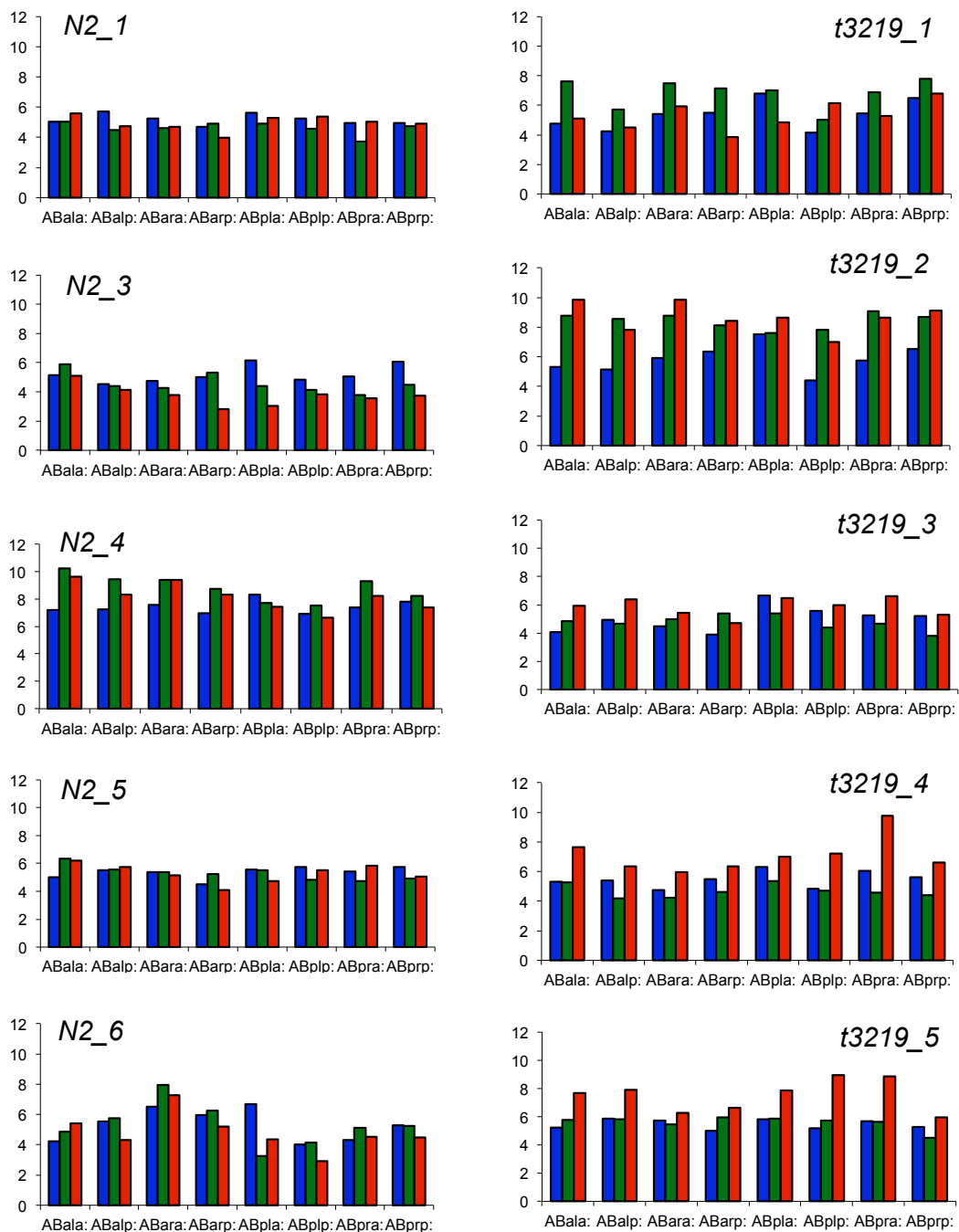
	Wildtyp					<i>let-19(t3219)</i>					
	1	2	3	4	Ø	1	2	3	4	5	Ø
Migration	95,0	84,4	87,8	92,2	89,8	108	130,5	89,7	99,2	105,8	106,7
Beeline	44,0	43,4	45,4	44,0	44,2	45	52,9	43,4	44	44	45,8
Quotient	2,2	1,9	1,9	2,1	2,0	2,4	2,5	2,1	2,3	2,4	2,3

Die Migration und die Beelines der Zellen der einzelnen Regionen des Embryos werden gesondert betrachtet. So soll festgestellt werden, ob die Defekte verstärkt in bestimmten Regionen auftreten. Die aufsummierte Zellmigration aller Zellen einer Region lässt sich in einem Diagramm darstellen (Abb. 37). Dabei werden die Bewegungen auf den drei räumlichen Achsen voneinander getrennt betrachtet. Die fünf analysierten Wildtyp-Embryonen zeigen eine Variabilität untereinander. In den Embryonen *N2\_1* und *N2\_5* bewegen sich die Zellen aller Regionen gleichmäßig in alle Richtungen. Die zurückgelegte Distanz aller Zellen der Regionen beträgt ungefähr 4-6 Embryolängen auf jeder Achse. In den Embryonen *N2\_3* und *N2\_6* ist die Zellmigration der Regionen unregelmäßiger. In *N2\_3* ist die Migration aller ABarp-Zellen in z-Richtung vermindert. Da diese Region eine ypsilonförmige Struktur bildet, die sich vor allem in x- und y-Richtung erstreckt, ist die verminderte Migration in z-Richtung nicht überraschend. In den anderen Embryonen ist die Migration von ABarp in der z-Ebene ebenfalls etwas vermindert. In den posterioren Regionen von *N2\_3* ist die Migration innerhalb der x-Ebene erhöht. Da sich diese Regionen innerhalb der Entwicklung ausstrecken, ist hier ebenfalls eine erhöhte Migration in x-Richtung schlüssig. Innerhalb des Embryos *N2\_6* migrieren die Zellen in der Region ABara deutlich stärker als andere Regionen. Ebenfalls auffällig ist die erhöhte Migration in x-Richtung der Zellen innerhalb ABpla. In *N2\_4* ist die Migration deutlich stärker als in den anderen Embryonen. Die Zellen einer Region legen hier ungefähr 6-10 Embryolängen pro Richtung zurück. Der Prozess der Zellmigration ist auch innerhalb des Wildtyps sehr variabel. Die DDMs zeigten, dass sich die Zellen erst im Zuge der achten und neunten Teilungsrunde sortieren. Es ist anzunehmen, dass die Zellen in verschiedenen Embryonen dabei unterschiedlich weit migrieren müssen, da das vorherige Niveau der Unordnung unterschiedlich war.

In *let-19(t3319)* liegt die Migration zwischen 4 – 10 Embryolängen pro Achse und ist damit insgesamt etwas höher als im Wildtyp. Auch in den analysierten Embryonen der Mutante ist Variabilität erkennbar. In dem Embryo *t3219\_1* ist vor allem die Migration in y-Richtung erhöht. Auch in *t3219\_2* ist die Migration in y-Richtung hoch, allerdings überwiegt die Migration in z-Richtung. In *t3219\_4* und *t3219\_5* erreichen die Migration in z-Richtung aller Zellen einer Region sogar teilweise bis zu 10 Embryolängen. Innerhalb der analysierten Embryonen von *let-19(t3219)* lässt sich kein Muster erkennen. Die Zellen migrieren zwar stärker als im Wildtyp, allerdings in unterschiedliche Richtungen.

## Migrationen in...

## Wildtyp

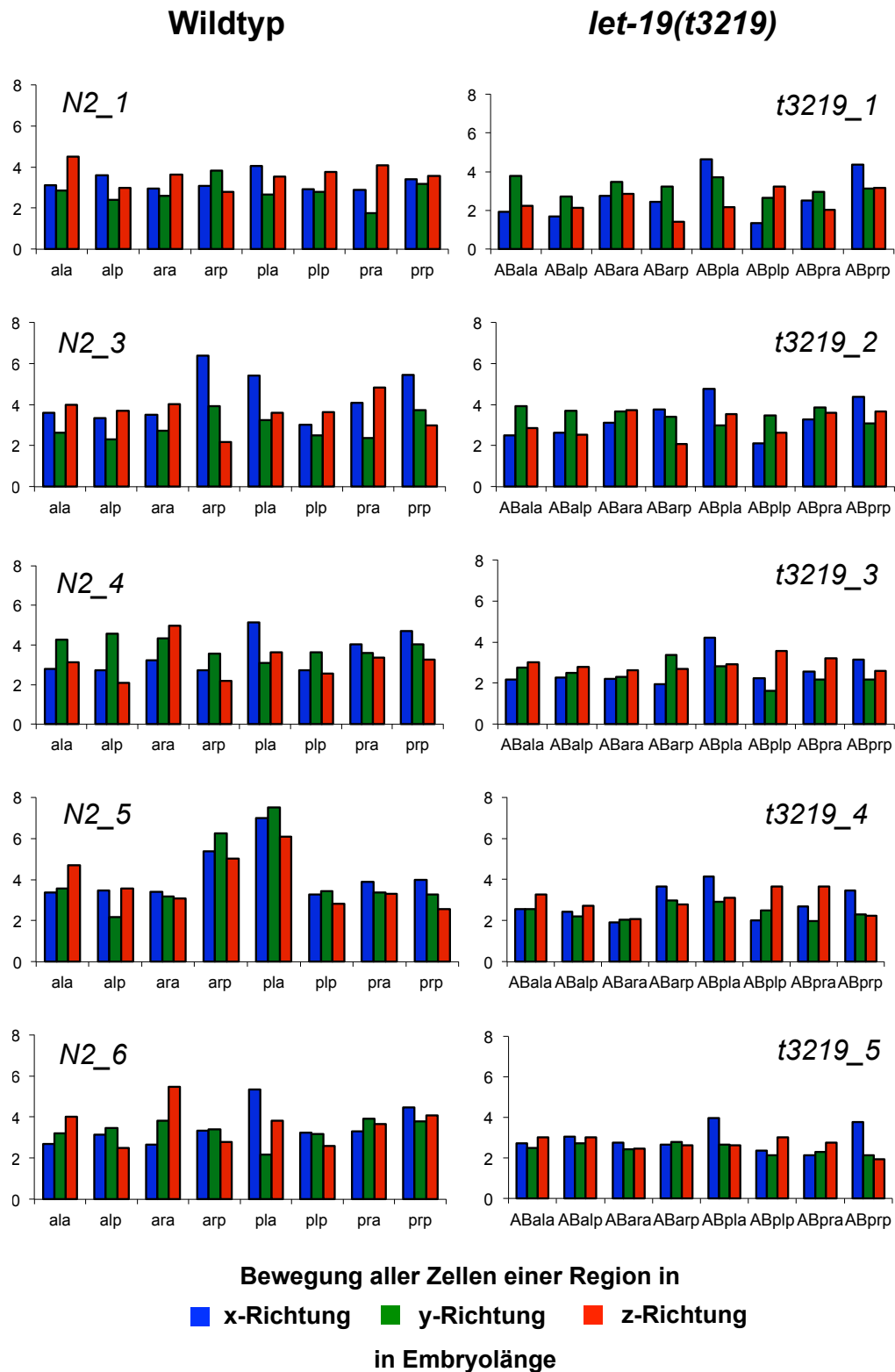
*let-19(t3219)*

**Abb. 37:** Die aufsummierte Migration aller Zellen einer Region innerhalb der drei Achsen werden im Wildtyp und in der Mutante *let-19(t3219)* verglichen. Die fünf Wildtyp-Embryonen sind recht unterschiedlich, die Zellen einer Region migrieren zwischen 4-6 Embryolängen. In *let-19(t3219)* ist die Migration mit 4-10 Embryolängen stärker ausgeprägt. Es lässt sich kein Muster erkennen.

Der Vergleich von Beelines zu Migrationen (Tab. 9) lässt vermuten, dass sich die Zellen in *let-19(t3219)* ungerichtet bewegen. Für eine genauere Analyse werden die Beelines aller Zellen einer Region über alle Achsen aufsummiert und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 38). Die Beelines der Zellen der einzelnen Regionen sind im Wildtyp recht variabel und liegen zwischen 2-8facher Embryolänge. In dem Embryo *N2\_3* fällt eine starke Verlängerung der Beeline in x-Richtung in den Zellen der Regionen ABarp, ABpla und ABprp auf. Eine Zunahme der Beelines in allen Richtungen ist in Embryo *N2\_5* in den Regionen ABarp und ABpla zu beobachten. Der Embryo *N2\_6* hat eine erhöhte Beeline in z-Richtung innerhalb der Region ABara und in x-Richtung in der Region ABpla. Die Zellen legen in ihrem finalen Sortierungsprozess unterschiedliche Distanzen zurück. Die Zellen in *let19(t3219)* zeigen etwas kürzere Beelines mit 2-5facher Embryolänge. Insgesamt ist die Migration in alle Richtungen ausgeglichen. Es lassen sich vereinzelt kleine Steigerungen der Beelines in x-Richtung feststellen. Es scheint, dass die Zellen im Wildtyp in der Sortierungsphase gezielt weite Distanzen zurücklegen um den korrekten Ort zu erreichen. In *let-19(t3219)* migrieren die Zellen zwar deutlich, legen dabei aber eher geringe Entfernungen zurück. Sie scheinen gleichmäßig durch den Embryo zu taumeln. Dies entspricht dem erwarteten Phänotyp einer Zellfokussierungsmutante. Die Zellen haben zwar ein korrektes Schicksal, aber sie verlaufen sich ziellos im Embryo.



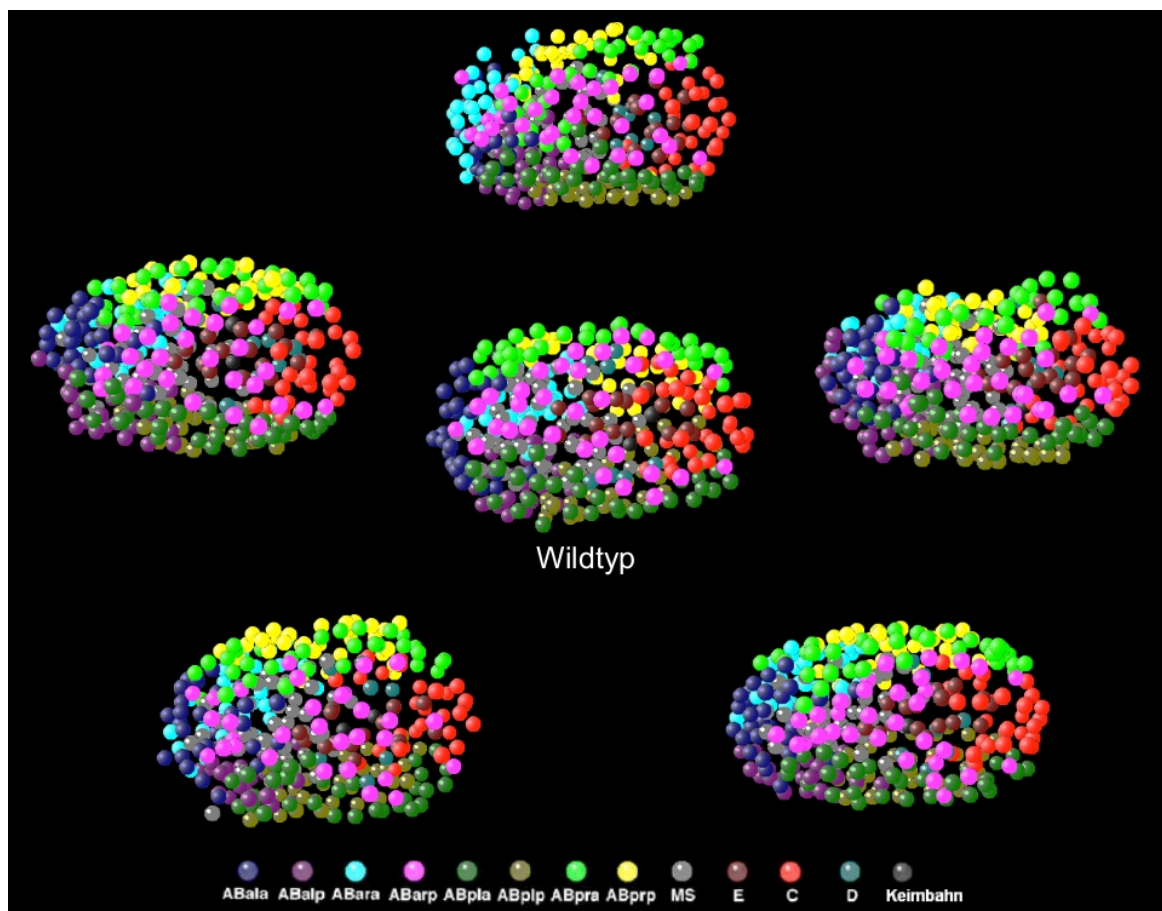
## Beelines in...



**Abb. 38:** Die aufsummierte Beelines aller Zellen einer Region innerhalb der drei Achsen werden im Wildtyp und in der Mutante *let-19(t3219)* verglichen. Die fünf Wildtyp-Embryonen sind recht unterschiedlich, die Beelines schwanken zwischen 2-8 Embryolängen. In *let-19(t3219)* sind die Beelines mit 2-5 Embryolängen etwas schwächer ausgeprägt. Die Zellen scheinen ziellos durch den Embryo zu taumeln.

## Visualisierung der Zellpositionen mit 3D-Repräsentationen in *let-19(t3219)*

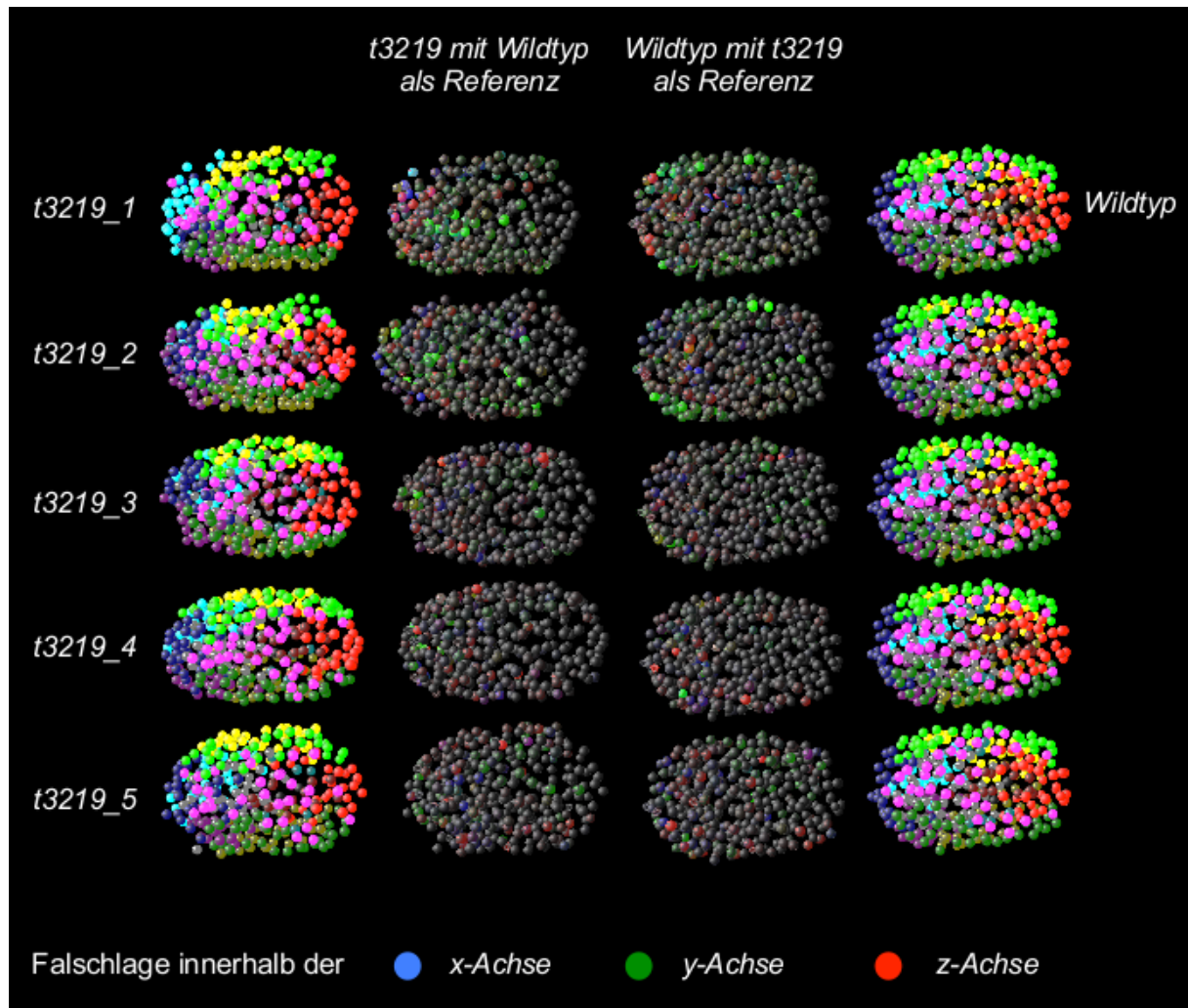
Um den Positionsdefekt im Kontext des Embryos darzustellen, werden die 3D-Repräsentationen analysiert. SIMI° Biocell hat durch die Zelllinienanalysen alle Positionsdaten gespeichert und stellt sie in einem Modell dar. So ist ein Vergleich mit dem Wildtyp möglich. Die fünf analysierten Embryonen von *let-19(t3219)* unterscheiden sich stark vom Wildtyp (Abb. 39). Besonders deutlich erkennt man dies an den Zellen der Region ABarp (pink). Diese bilden im Wildtyp eine ypsilonförmige Struktur. In den Embryonen der Mutante ist diese Struktur verschieden schwer gestört. Der Phänotyp scheint folglich unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein. Dies entspricht den Beobachtungen aus den Distanzkarten.



**Abb. 39: 3D-Repräsentationen der Mutante *let-19(t3219)* im Vergleich zum Wildtyp (Mitte).** Die Zellpositionierung unterscheidet sich vom Wildtyp. Dabei scheint der Fehler in der Zellpositionierung verschieden stark ausgeprägt zu sein.

Vergleicht man nun die 3D-Repräsentationen von *let-19(t3219)* mit dem Wildtyp, kann man ermitteln welche Zellen falsch liegen (Abb. 40). Dazu werden zuerst die

Zellpositionen in *let-19(t3219)* mit dem Wildtyp als Referenz berechnet. Korrekt positionierte Zellen werden schwarz eingefärbt. Weicht die Lage der jeweiligen Zellen in *let-19(t3219)* vom Wildtyp ab, wird die Zelle eingefärbt. Blau bezeichnet dabei die Falschlage in x-Richtung, grün die Falschlage in y-Richtung und rot die Falschlage in z-Richtung. Falsche Positionierungen die mehrere Achsen betreffen, werden in Mischfarben dargestellt. Als Hinweis, wo die betroffenen Zellen im Wildtyp sitzen, wird auch die Zellpositionierung im Wildtyp mit *let-19(t3219)* als Referenz ermittelt. Wir erhalten so Kugelmodelle, in denen dieselben Zellen markiert sind. So lässt sich ermitteln, welche Zellen falsch liegen und direkt ihre Positionierung in Mutante und Wildtyp vergleichen. In den Embryonen *t3219\_1* und *t3219\_2* fallen vor allem Verschiebungen innerhalb der y-Achse auf. Diese betreffen Zellen aus unterschiedlichen Regionen wie ABalp, ABarp und ABpra. Die anderen Embryonen zeigen deutlich weniger Fehlpositionen. Am Häufigsten sind Fehlpositionierungen innerhalb der x- und z-Achse. Hierbei sind unterschiedliche Zellen betroffen. Ein gemeinsames Muster an falscher Zellpositionierung innerhalb der Mutante ist nicht zu erkennen.



**Abb. 40: Vergleich der 3D-Repräsentationen von *let-19(t3219)* und des Wildtyps.** Die Embryonen *t3219\_1* und *t3219\_2* weisen vor allem Verschiebungen in der y-Achse auf. Die Embryonen *t3219\_3*, *t3219\_4* und *t3219\_5* weisen weniger Fehlpositionen auf.

*let-19(t3219)* hat deutliche Fehler innerhalb der Zellpositionierung, allerdings variieren die Embryonen untereinander stark. Ein gemeinsames Muster lässt sich hier nicht erkennen.

Im Wildtyp sind die Zellen im 128-AB-Zellstadium noch recht variabel angeordnet. Dann scheint jedoch ein Sortierungsprozess in Gang zu treten, indem die Zellen an ihre richtige Position gelangen. Dieser Sortierungsprozess läuft in *let-19(t3219)* anscheinend nur unvollständig ab. Trotz korrektem Schicksal finden die Zellen nicht ihren richtigen Platz. LET-19 steuert über die CDK-Domäne innerhalb des Mediatorkomplexes die Transkription verschiedener Gene. Mindestens eines davon scheint für korrekte Zellsortierung in der Embryogenese verantwortlich zu sein.

## Detektion der Expression von LET-19 mittels eines GFP-Markergens

Eine *let-19::GFP*-Proteinfusion sollte Auskunft über die Expression des Gens geben. Dazu wurde *let-19* mit der GFP-Sequenz am Stopcodon in den Vektor pHE780 kloniert. Mit diesem Konstrukt wurde die Mutante *t3219* 24-mal transformiert. Bei der restriktiven Temperatur ließen sich keine Linien etablieren, das Konstrukt scheint nicht zu komplementieren. Ein Teil der Würmer wurde bei der permissiven Temperatur inkubiert und auf die Expression des co-transformierten Pharynxmarkers pPD118.33ΔmCherry selektiert. Es ließen sich 23 Linien etablieren, von denen keine bei der restriktiven Temperatur lebensfähige Nachkommen hatte. Sieben Linien wurden bei der permissiven Temperatur auf GFP-Expression überprüft. Es war keine Expression zu erkennen.

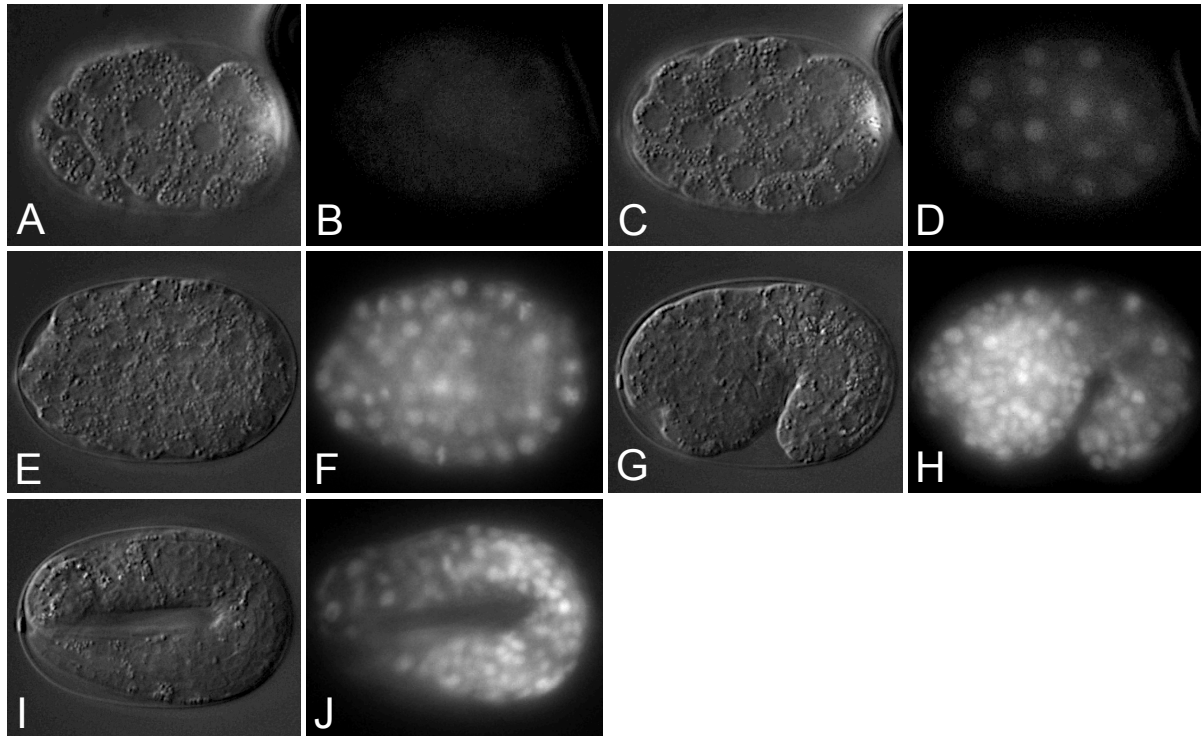
Das Fusionsprotein scheint nicht funktionsfähig zu sein. Es komplementiert weder die Mutante, noch wird GFP exprimiert.

Sophie Ziegler stellte im Zuge ihrer Bachelor-Arbeit ein Konstrukt her, in dem der Promoter von *let-19* mit dem Gen für ein Histon in einem H2B::GFP-Fusionskonstrukt verbunden wurde. So soll ermittelt werden, wann und in welchen Zellen *let-19* exprimiert wird. Das Konstrukt wurde mittels biolistischer Transformation in die Gonade junger Adulter gebracht, die es an ihre Nachkommen weitergaben.

In der 4D-Aufnahme zeigte sich der Beginn der Expression kurz nach dem Einwandern der Darmvorläuferzellen Ea und Ep. Die Expression war noch sehr schwach und anscheinend noch auf die Darmvorläuferzellen beschränkt (Abb. 41 A+B). Kurze Zeit später begann ein Großteil der Zellen ebenfalls *let-19* zu exprimieren, in fast allen Zellen ließ sich GFP-Expression erkennen (Abb. 41 C+D). In den späteren Stadien exprimierten alle Zellen im Embryo *let-19*. Das GFP-Signal war stark und gut zu erkennen. Die Expression dauerte die vollständige Embryogenese an (Abb. 41 E-J) (Ziegler, 2012).

Die temperatursensitive Phase von *let-19(t3219)* scheint sich von Beginn der Embryogenese bis zum 400-Zeller zu erstrecken. Allerdings wurde vermutet, dass LET-19 auch später innerhalb der Embryogenese benötigt wird. Diese Vermutung bestätigt sich in diesem Experiment. Das GFP-Signal ist bis zum Ende der Embryonalentwicklung deutlich sichtbar. Der Start der Expression scheint nicht mit

der temperatursensitiven Phase übereinzustimmen, sondern deutlich zu spät zu starten. Dies lässt sich mit dem Mechanismus des ‚array silencings‘ erklären (Kelly *et al.*, 1997; Stinchcomb *et al.*, 1985). Der besagt, dass extrachromosomale Arrays oft nicht maternal exprimiert werden, daher zeigt sich in der Aufnahme innerhalb der ersten Zellteilungen noch kein GFP-Signal. LET-19 wird auch früher in der Embryonalentwicklung benötigt.



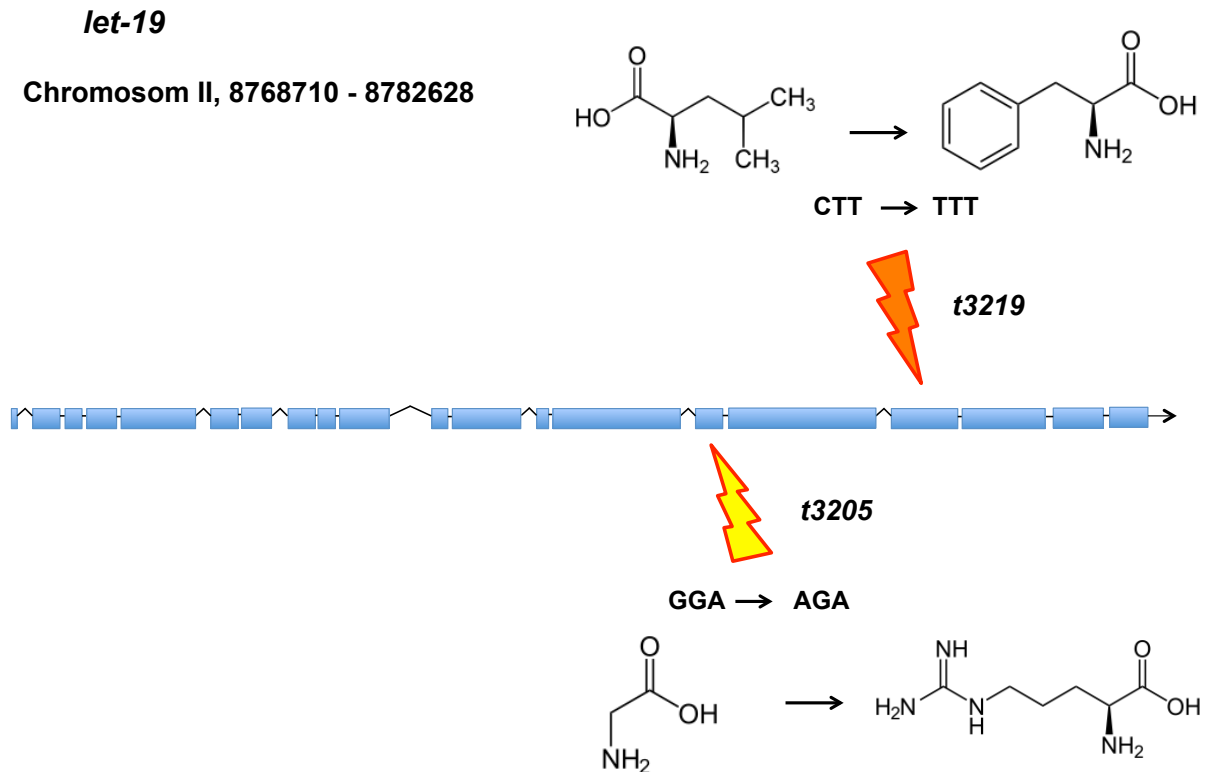
**Abb. 41: Analyse der Expression von *let-19* mit einem Promotor-H2B::GFP-Fusionsprodukt.** (A, C, E, G, I ) Normarski-Aufnahmen eines Wildtyp-Embryos, der erfolgreich mit dem Promoter-GFP-Fusionskonstrukt transformiert wurde. (B, D, F, H, J) Zugehöriger GFP-Scan. Eine erste Expression zeigte sich kurz nach Einwandern der Darmvorläuferzellen. Im weiteren Verlauf ließ sich in allen Zellen Expression erkennen.

### Vergleich der Mutanten *let-19(t3219)* und *let-19(t3205)*

Anne Wiekenberg isolierte im Zuge der Mutantenlese in Dresden die Mutante *let-19(t3205)*. Der Phänotyp dieser Mutante unterscheidet sich deutlich von *let-19(t3219)*. Die Zellschicksale entsprechen nicht dem Wildtyp. Dafür ist die Positionierung der Zellen zwar nicht korrekt, aber deutlich weniger falsch, als in anderen Mutanten mit Schicksalsdefekten (Wiekenberg, 2012). Insgesamt ist der Phänotyp dieses Allel stärker ausgeprägt, als der Phänotyp von *let-19(t3219)*.



Die Mutation *let-19(t3205)* liegt im 15. Exon. Auf Proteinebene wird statt eines Glycins ein Arginin eingebaut (Abb. 42). Es handelt sich bei *let-19(t3219)* und *let-19(t3205)* um zwei verschiedene, unabhängige Mutationen.



**Abb.42: *t3219* und *t3205* sind unabhängige Mutationen in dem Gen *let-19*.** *let-19(t3205)* liegt im 15. Exon. Auf Proteinebene wird ein Arginin anstatt eines Glycins eingebaut. *let-19(t3219)* liegt im 17. Exon. Im Protein findet man Phenylalanin anstatt Leucin.

Es ist auffällig, dass beide Mutationen identische Hintergrundmutationen tragen. In dem Gen *vhp-1* liegt eine Missense-Mutation vor. Dieses Gen codiert für eine MAP-Kinase-Phosphatase. Eine weitere Missense-Mutation findet man in *T01E8.1*, das für ein Protein mit unbekannter Funktion codiert. *F54H5.2* codiert für eine Casein-Kinase. In diesem Gen liegt eine Nonsense-Mutation vor.

Es lässt sich nicht eindeutig sagen, ob diese Mutationen normale Hintergrundmutationen sind, die standartmäßig in dem verwendeten Wildtyp-Stamm vorliegen. Dabei sind sie teilweise auch deutlich von *let-19* entfernt, was gegen eine herkömmliche Kopplung spricht. Die beiden Mutanten *let-19(t3219)* und *let-19(t3205)* stammen aus zeitlich entfernten, unabhängigen Mutagenesen. Die ebenfalls sequenzierte Mutante *sem-4(t3206)* weist die drei Mutationen nicht auf. Es lässt sich spekulieren, dass die drei Mutationen in *vhp-1*, *T01E8.1* und *F54H5.3* eine Mutation

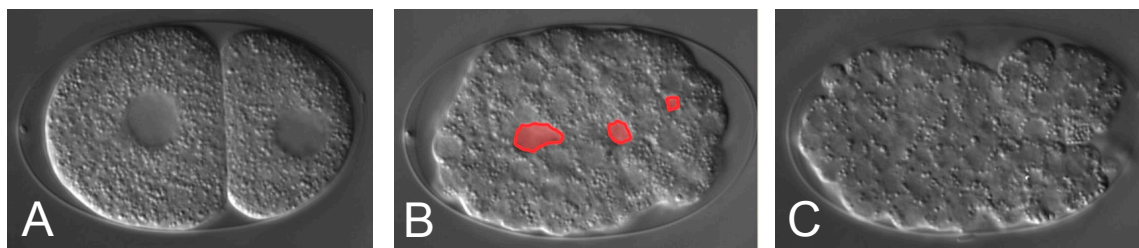
in *let-19* erst ermöglichen. In der Arbeitsgruppe von Oliver Hobert wurden sogar Kopplungen von Mutationen auf verschiedenen Chromosomen beobachtet (Sarin *et al.*, 2010). Es wäre hier interessant andere Allele von *let-19* auf die drei Mutationen *vhp-1*, *T01E8.1* und *F54H5.3* zu überprüfen.



## Die Zelladhäsionsmutante *t2732*

Die Mutante *t2732* wurde von Arend Hintze im Zuge seiner Dissertation isoliert und teilweise charakterisiert (Hintze, 2007). Im Zuge meiner Diplomarbeit versuchte ich die Ergebnisse zu reproduzieren. Überraschenderweise unterschied sich der von mir beobachtete Phänotyp sehr stark von dem bisher beschriebenen Phänotyp. Daher befasst sich ein Teil dieser Dissertation mit einer Neu-Charakterisierung von *t2732*. Erste Beobachtungen aus meiner Diplomarbeit werden zum besseren Verständnis ebenfalls hier aufgeführt (Martin, 2008).

Anders als *let-19(t3219)* hat *t2732* bei der restriktiven Temperatur einen Defekt in der Zelladhäsion. Während der Entwicklung bilden sich große Hohlräume zwischen den Zellen (Abb. 43 B). Die Schicksale stimmen nicht mit denen des Wildtyps überein und der Zellzyklus der Mutante wird deutlich asynchron.



**Abb. 43: Phänotyp der temperatursensitiven Mutante *t2732* bei restriktiver Temperatur**  
(A) Zweizellstadium (B) Hohlräume im Verlauf der Embryonalentwicklung (C) terminaler Phänotyp

## Klonierung des Genes *t2732*

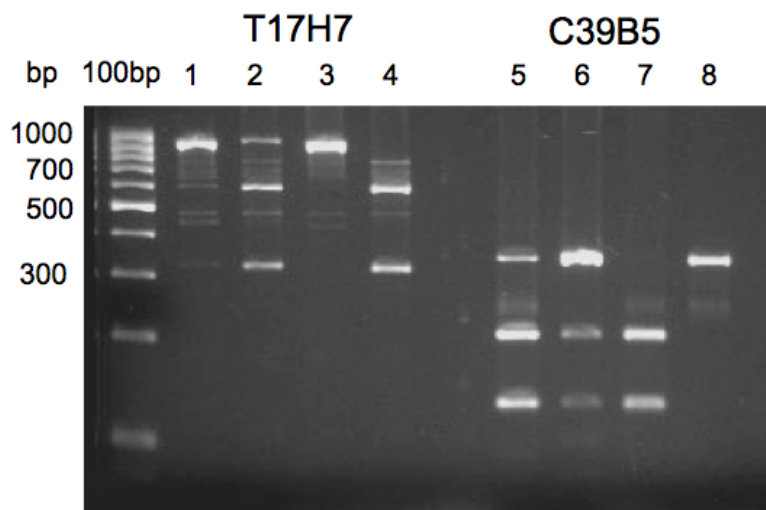
### Klonierung von *t2732* mittels konventionellem SNP-Mappings

Im Zuge der Dissertation von Arend Hintze wurde die Mutation *t2732* bereits auf den linken Arm von Chromosom III kartiert. Um nun eine genauere Aussage über ihre Position zu treffen, wurde hier noch eine Feinkartierung durchgeführt. Man verwendete hierfür den *C. elegans*-Stamm *CB4856* (Hawaii). Wie bereits im Abschnitt „Klonierung von *t3219* mittels konventionellen SNP-Mappings“ erläutert, weist *CB4856* verschiedene Polymorphismen auf, die neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme in der DNA hervorrufen (Wicks *et al.*, 2001). Für eine Feinkartierung wurden neun SNPs untersucht, die sich auf dem linken Arm von

Chromosom III befinden. Sie decken den Bereich von -26,98 bis -0,2 auf der genetischen Karte ab. Das entstehende Bandenmuster ist in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Zur Kartierung verwendete SNPs für *t2732***

SNP	Position	Größe	Restriktionsenzym	Bandenmuster Wildtyp [bp]	Bandenmuster <i>CB4856</i> [bp]
pkP3081	-26,98	371	<i>TaqI</i>	222, 149	195, 145, 27
T17H7	-26,33	910	<i>SspI</i>	910	580, 330
C39B5	-18	347	<i>AccII</i>	212, 135	347
H06I04	-10,04	438	<i>SpeI</i>	438	268, 170
F34D10	-4,6	515	<i>MseI</i>	378, 52, 44, 41	293, 85, 52, 44, 41
W03A5	-1,7	365	<i>MseI</i>	365	210, 163
C08C3	-0,55	843	<i>ApoI</i>	517, 222, 102	739, 104
F10E9	-0,31	854	<i>AccI</i>	598, 255	854
ZK1236	-0,2	640	<i>NsiI</i>	463, 176	640

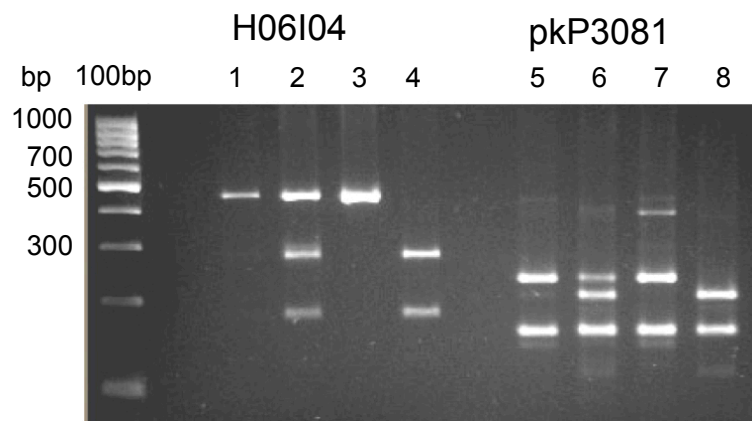


**Abb. 44: Analyse der SNPs T17H7 und C39B5 mittels Agarosegelelektrophorese.**

Links ist DNA aufgetragen, die den SNP T17H7 beinhaltet: 1) temperatursensitive Nachkommen. 2) temperaturtolerante Nachkommen. 3) Wildtyp. 4) *CB4856*. In Spur 1 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

Rechts ist DNA aufgetragen, die den SNP C39B5 beinhaltet: 5) temperatursensitive Nachkommen. 6) temperaturtolerante Nachkommen. 7) Wildtyp. 8) *CB4856*. In Spur 5 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

Die Untersuchung der DNA der temperatursensitiven Nachkommen auf die SNPs T17H7 und C39B5 (Abb. 44) zeigte ein Bandenmuster, in dem sowohl Wildtyp- als auch *CB4856*-spezifische Banden vorkommen. Es trat also deutliche Rekombination zwischen der temperatursensitiven Mutation und den SNPs auf. Folglich ist die temperatursensitive Mutation nicht eng an diese SNPs gekoppelt.

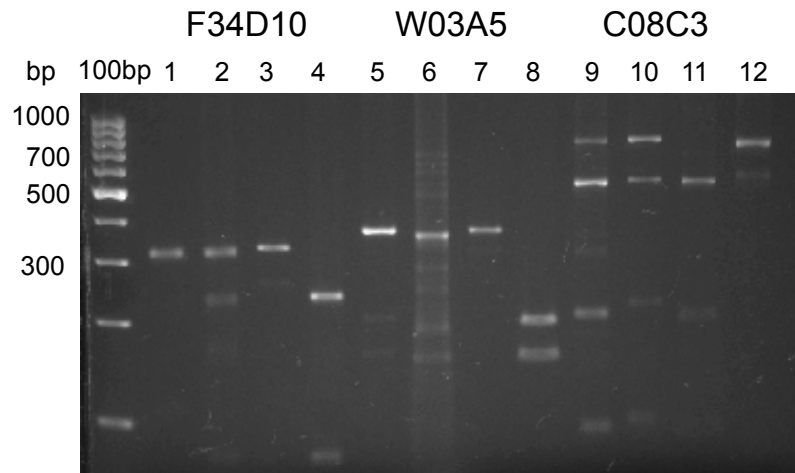


**Abb. 45: Analyse der SNPs H06I04 und pkP3081 mittels Agarosegelelektrophorese.**

Links ist DNA aufgetragen, die den SNP H06I04 beinhaltet: 1) temperatursensitive Nachkommen. 2) temperaturtolerante Nachkommen. 3) Wildtyp. 4) *CB4856*. In Spur 1 lässt sich nur die Wildtypvariante nachweisen – dies spricht für eine enge Kopplung.

Rechts ist DNA aufgetragen, die den SNP pkP3081 beinhaltet: 5) temperatursensitive Nachkommen. 6) temperaturtolerante Nachkommen. 7) Wildtyp. 8) *CB4856*. In Spur 5 lässt sich überwiegend die Wildtypvariante nachweisen – dies spricht für eine enge Kopplung.

Zwischen dem SNP pkP3081 und der temperatursensitiven Mutation traten kaum Rekombinationsereignisse auf (Abb. 45), in der Spur mit DNA von temperatursensitiven Nachkommen ließ sich fast ausschließlich das Wildtyp-Bandenmuster erkennen. *t2732* und pkP3081 scheinen eng gekoppelt. Allerdings war auch in der Analyse des SNP H06I04 nur sehr schwach Rekombination erkennbar und lässt eine engere Kopplung vermuten (Abb. 45). Die Banden bei 268 und 170 bp in der Spur der temperatursensitiven Nachkommen waren nur zu erraten. Da die SNPs pkP3081 und H06I04 weit entfernt voneinander liegen, ist dieses Ergebnis unerwartet.



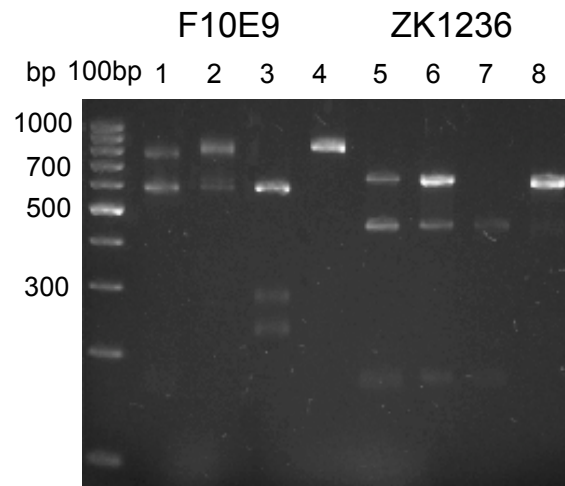
**Abb. 46. Analyse der SNPs F34D10, W03A5 und C08C3 mittels Agarosegelelektrophorese.**

Links ist DNA aufgetragen, die den SNP F34D10 beinhaltet: 1) temperatursensitive Nachkommen. 2) temperaturtolerante Nachkommen. 3) Wildtyp. 4) *CB4856*. In Spur 1 lässt sich nur die Wildtypvariante nachweisen – dies spricht für eine enge Kopplung.

Mittig ist DNA aufgetragen, die den SNP W03A5 beinhaltet: 5) temperatursensitive Nachkommen. 6) temperaturtolerante Nachkommen. 7) Wildtyp. 8) *CB4856*. In Spur 5 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

Rechts ist DNA aufgetragen, die den SNP C08C3 beinhaltet: 9) temperatursensitive Nachkommen. 10) temperaturtolerante Nachkommen. 11) Wildtyp. 12) *CB4856*. In Spur 9 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

Es traten kaum Rekombinationsereignisse zwischen dem SNP F34D10 und der temperatursensitiven Mutante auf. Eine enge Kopplung lässt sich nicht ausschließen. Die SNPs W03A5 und C08C3 sind offensichtlich nicht eng an die Mutation gekoppelt, die Rekombinationsereignisse waren deutlich sichtbar. (Abb. 46)



**Abb. 47: Analyse der SNPs F10E9 und ZK1236 mittels Agarosegelelektrophorese.**

Links ist DNA aufgetragen, die den SNP F10E9 beinhaltet: 1) temperatursensitive Nachkommen. 2) temperaturtolerante Nachkommen. 3) Wildtyp. 4) *CB4856*. In Spur 1 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

Rechts ist DNA aufgetragen, die den SNP ZK1236 beinhaltet: 5) temperatursensitive Nachkommen. 6) temperaturtolerante Nachkommen. 7) Wildtyp. 8) *CB4856*. In Spur 5 lassen sich Wildtyp- und *CB4856*-Variante nachweisen. Zwischen SNP und temperatursensitiver Mutation traten Rekombinationsereignisse auf.

Zwischen den SNPs F10E9 und ZK1236 und der temperatursensitiven Mutation traten Rekombinationsereignisse auf. Die Mutation scheint deutlich von den SNPs entfernt zu liegen.

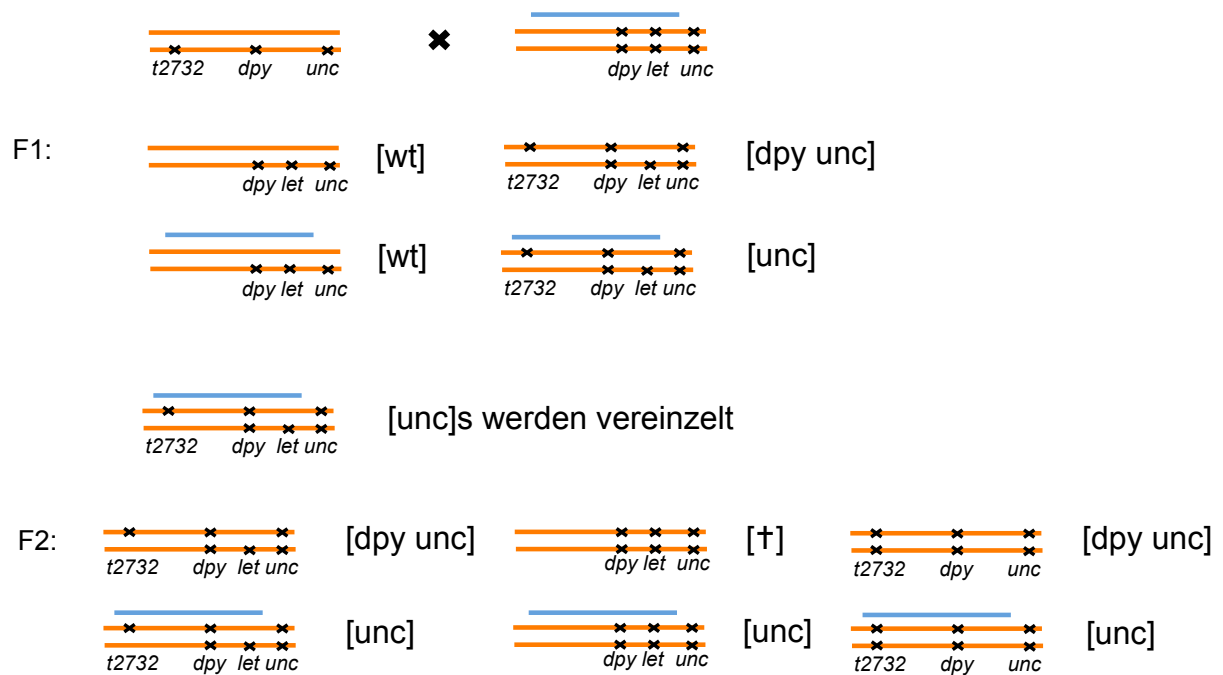
Die temperatursensitive Mutation scheint sowohl an den SNP im Bereich -26,98 als auch an die SNPs im Bereich von -10,04 bzw. -4,6 gekoppelt zu sein. Diese Ergebnisse scheinen sich zu widersprechen. Mittels diesem konventionellen SNP-Mappings ließ sich die Position der temperatursensitiven Mutation nicht endgültig lokalisieren.

### Komplementation der Mutation mittels einer Duplikation

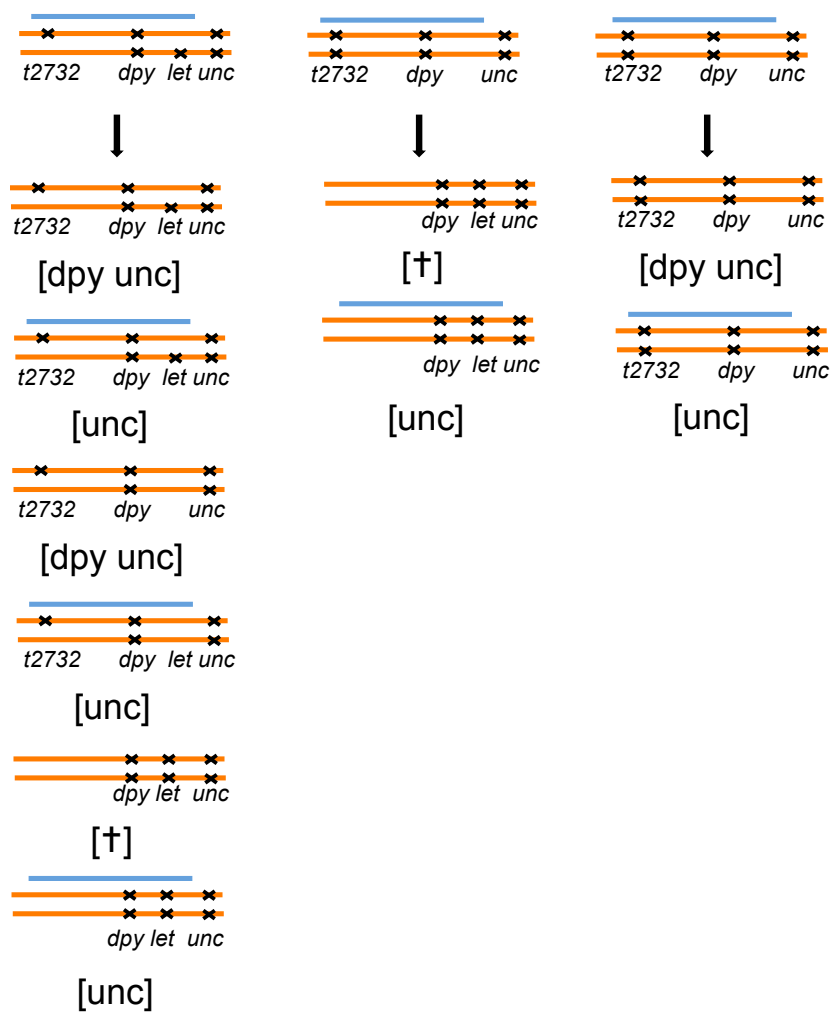
Freie chromosomale Duplikationen werden in *C. elegans* mit hoher Frequenz an die Nachkommen vererbt. Die freie Duplikation sDp3 überdeckt den Bereich von -23,1 bis -0,1 auf Chromosom III (genomische Karte) (Rosenblut *et al.*, 1985). Liegt die temperatursensitive Mutation ebenfalls in diesem Bereich, sollte die Duplikation sie komplementieren. Es lässt sich damit eine Aussage treffen, ob *t2732* unter der Duplikation oder weiter links auf Chromosom III lokalisiert ist. Der Stamm BC4172

trägt neben der Duplikation außerdem die Mutationen *dpy-17(e164)*, *unc-32(e189)* und *let-707(s2462)*. Dabei werden *dpy-17(e164)* und *let-707(s2462)* von der Duplikation komplementiert. Nachkommen, die die Duplikation verloren haben, haben einen *[dpy unc]*-Phänotyp und arretieren früh in der Entwicklung.

Für diese Kreuzung wurde erst die Mutation *t2732* mit *dpy-17(e167)* und *unc-32(e189)* gekoppelt. Dieser Stamm wird dann heterozygot mit BC4172 gekreuzt.



Die Nachkommen mit *[unc]*-Phänotyp werden vereinzelt (n=60).



Die Gelege der vereinzelt F3-Nachkommen mit *[unc]*-Phänotyp wurden analysiert: Traten arretierte Larven auf, ist das Gelege nicht mehr von Interesse und wurde aussortiert. Würmer mit *[dpy unc]*-Phänotyp wurden auf Temperatursensitivität untersucht. Bei positivem Ergebnis wurden vom gleichen Gelege Würmer mit dem *[unc]*-Phänotyp auf Temperatursensitivität getestet. Hier lebten die Nachkommen bei der restriktiven Temperatur. Die Duplikation komplementierte die temperatursensitive Mutation in *t2732*.

## Lokalisierung der temperatursensitiven Mutation mittels einer

### Dreifaktorkreuzung

Im Zuge ihrer Bachelor-Arbeit führte Anja Letz eine Dreifaktorkreuzung mit *t2732* durch (Letz, 2009). Bei dieser klassischen Art des Genkartierens werden Rekombinationsereignisse mittels Neuverteilung von sichtbaren Markern detektiert. Daraus lassen sich dann Rückschlüsse auf die Position der zu kartierenden Mutation ziehen (Fay, 2006). Als Marker wurde die Mutation *dpy-1(e1)* gewählt, die sich bei -15.66 (genomische Karte) links auf Chromosom III befindet und *unc-32(e189)*, die sich bei 0,00 mittig auf Chromosom III befindet.

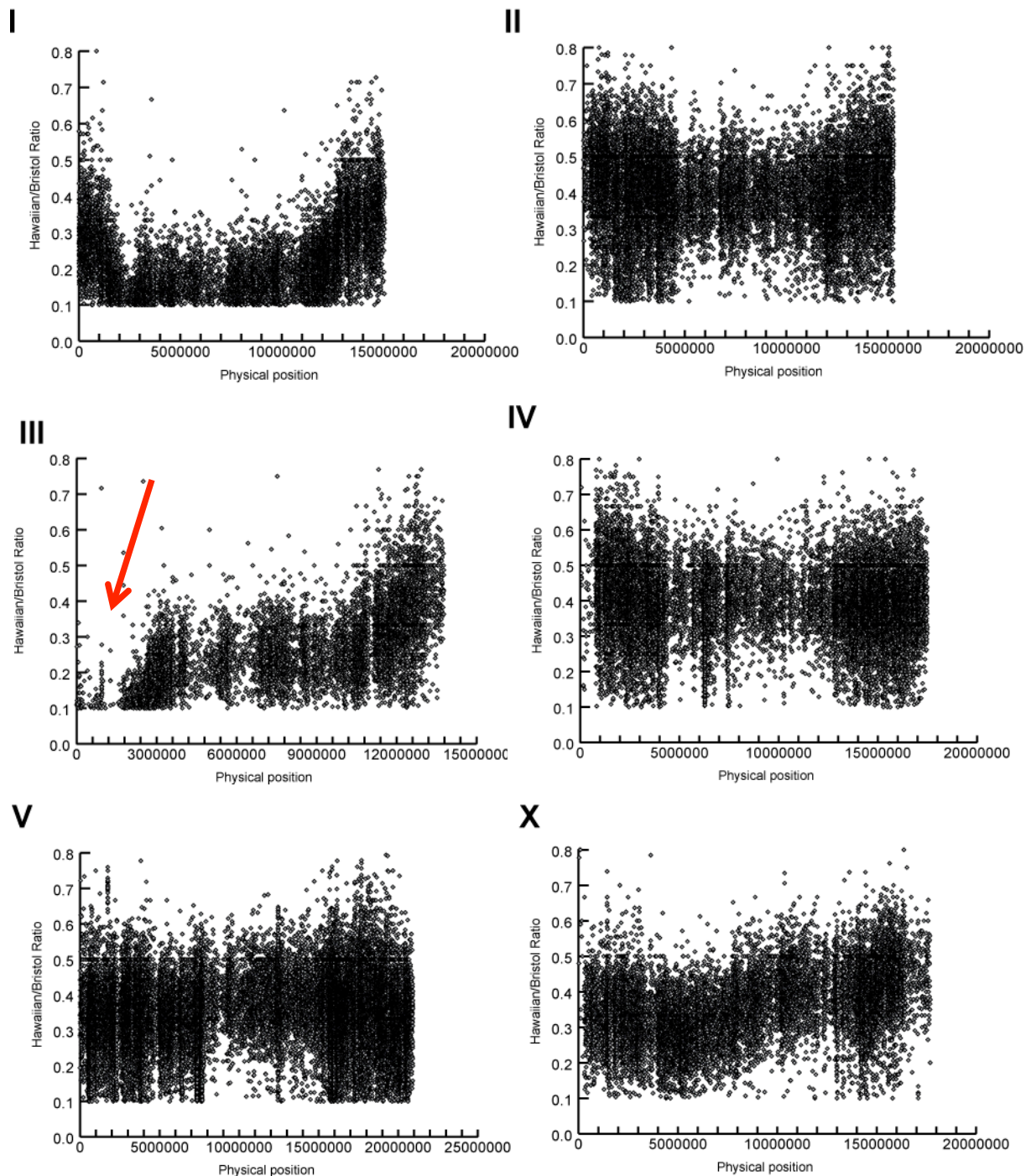
*t2732* wurde mit der Doppelmutante *dpy-1(e1) unc-32(e189)* gekreuzt. In der F2-Generation traten nun neben den Phänotypen der Eltern auch die einzelnen, entkoppelten Marker auf. Diese wurden vereinzelt (n=50) und auf die temperatursensitive Mutation hin überprüft. Nur zwei der vereinzelter *dpy-nicht-unc*-Nachkommen legten bei der restriktiven Temperatur ausschließlich tote Eier. Bei den *unc-nicht-dpy*-Nachkommen legten hingegen alle vereinzelter Würmer ausschließlich tote Eier bei der restriktiven Temperatur. Dieses Ergebnis lässt verschiedene Schlüsse zu. Die temperatursensitive Mutation ist anscheinend recht eng an *dpy-1(e1)* gekoppelt, da zwischen ihr und dem sichtbaren Marker kaum Rekombination stattfand. Zwischen der temperatursensitive Mutation und *unc-32(e189)* kam es zu Rekombinationsereignissen, die Mutationen liegen folglich in größerem Abstand zueinander.

### Klonierung von *t2732* mittels Whole-Genome-Sequencings

Im Labor von Oliver Hobert werden mit der Methode des Whole Genome Sequencings ein SNP-Mapping mit einer Sequenzierung verbunden. So lassen sich Mutationen in Stämmen schnell und sicher detektieren (siehe Abschnitt „Klonierung von *let-19(t3219)* mittels Whole-Genome-Sequencings“). Im Zuge einer Kooperation untersuchte die Hobert-Group die temperatursensitive Mutante *t2732*. Das Whole-Genome-Sequencing bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse. Es sei eine starke Kopplung an den linken Bereich des Chromosom III vorhanden. Die Ergebnisse lassen sich graphisch darstellen (Abb. 48). Wenn der SNP und die temperatursensitive Mutation eng gekoppelt sind, tritt zwischen ihnen wenig bis keine



Rekombination auf. Das Verhältnis von detektierten Hawaii-Varianten zur Gesamtzahl wird folglich geringer. Dies ist in der Analyse von Chromosom III der Fall. Im Bereich von 0 – 3 MB vom linken Chromosomenende ist kaum Rekombination zu sehen. Die temperatursensitive Mutation scheint in diesem Abschnitt zu liegen.



**Abb. 48: Verhältnis von detektierten Hawaii-Varianten zur Gesamtanzahl auf allen Chromosomen nach einem SNP-Mapping von *t2732*.** Auf Chromosom III ist im Bereich von 0 – 3 MB vom linken Chromosomenende eine starke Kopplung zu erkennen. Die temperatursensitive Mutation scheint sich in diesem Bereich zu befinden.

Eine geringe Kopplung scheint außerdem an einen Bereich auf dem linken Arm von Chromosom I vorzuliegen. Allerdings finden sich dort keine Abschnitte in dem ausschließlich die Wildtyp-Sequenz vorliegt (persönliche Kommunikation Oliver Hobert). Es traten folglich Rekombinationsereignisse auf und die temperatursensitive Mutation kann daher nicht in diesem Bereich lokalisiert sein. Es wäre allerdings denkbar, dass hier in der ursprünglichen Mutante ein Modifier vorlag, der im Laufe der Kreuzungen wegfiel.

Im Bereich auf Chromosom III ließen sich 34 Mutationen detektieren (siehe Anhang). Davon sind allerdings nur drei Mutationen in proteincodierenden Bereichen. Die übrigen 31 Mutationen sind nicht innerhalb der Gensequenzen sondern strangauf- oder strangabwärts lokalisiert.

Chr	Start	Reference Base	Sample Base	Class	Description	Gene
III	1414051	G	A	missense	CCG->CTG [Pro ->Leu]	Y82E9BR.14 (glycolipid transfer protein)
III	1506296	G	A	missense	GGA->GAA [Gly ->Glu]	M01G5.1 (unknown)
III	2679513	G	A	missense	GCT->ACT [Ala ->Thr]	<i>let-805</i> (myotactin)

**Abb. 49: Liste der potentiellen temperatursensitiven Mutationen für *t2732*.** Die Kombination aus SNP-Mapping und Whole-Genome-Sequencing ergibt folgende Mutationen in proteincodierenden Bereichen als potentielle Kandidaten für *t2732*. Die rot hinterlegten Mutationen liegen in dem Bereich der stärksten Kopplung und sind folglich die wahrscheinlichsten Kandidaten.

Im Bereich der stärksten Kopplung zwischen temperatursensitiver Mutation und Wildtyp-SNP liegen Mutationen in den Genen *Y82E9BR.14* und *M01G5.1*. *Y82E9BR.14* kodiert für ein Glycolipidtransferprotein. In der Zelle wird der Transport von Glycosphingolipiden zwischen Membranen von diesen Proteinen katalysiert (Brown & Mattjus, 2007). Die Funktion von *M01G5.1* ist noch nicht bekannt. Etwas entfernt von diesem Bereich liegt noch *let-805*. Dieses Gen kodiert für Myotactin, ein Transmembranprotein, das für den Zusammenhalt von Muskeln und Hypodermis zuständig ist (Hresko *et al.*, 1999).

Mutationen in jedem dieser Gene könnten solch einen Phänotyp hervorrufen. Allerdings entsteht der beobachtete Zellfokussierungsphänotyp der Mutante *t3091* durch eine temperatursensitive Mutation in dem Gen der Phosphomannomutase 2

(Memar, 2012). Ein Zuckercode auf der Zelloberfläche scheint dort essentiell für das richtige Sortieren der Zellen zu sein. Ist nun solch ein Zuckercode durch eine Mutation in einem Glycolipidtransferprotein gestört, kann dies in falschen Zellschicksalen, falscher Migration und mangelnder Zelladhäsion wie in *t2732* beobachtet, resultieren. *Y82E9BR.14* ist somit ein sehr wahrscheinliches Kandidatengen.

### Komplementationstest mit *let-805(st456)*

Der Stamm RW3625 trägt die embryonal letale Mutation *let-805(st456)* unter dem Balancer *qC1* (Hresko *et al.*, 1999). Ein Balancerchromosom verhindert Rekombinationsereignisse, so dass sich rezessive Mutationen in einem Stamm erhalten lassen. Durch eine Kreuzung von RW3625 mit *t2732* ließ sich ermitteln, ob die sequenzierte Missense-Mutation in *let-805* für den temperatursensitiven Phänotyp in *t2732* verantwortlich ist.

Möglichkeit A: *let-805(st456)* komplementiert *t2732*:

$$\begin{array}{lcl}
 \text{P:} & \frac{t2732}{t2732} & \times \quad \frac{\frac{let-805(st456)}{qC1} + \frac{+}{dpy-19(e1259)} + \frac{+}{glp-1(q339)}}{+} \\
 \\
 \text{F1:} & \frac{\frac{t2732}{+} + \frac{+}{let-805}}{+} & \frac{\frac{t2732}{qC1} + \frac{+}{dpy-19} + \frac{+}{glp-1}}{+}
 \end{array}$$

Die F1-Nachkommen wurden vereinzelt. Folgende Genotypen entstanden in der F2:

$$\frac{t2732 +}{+ let-805} \quad \text{segregiert in....}$$

$\frac{t2732 +}{t2732 +}$	$\frac{t2732 +}{+ let-805}$	$\frac{+ let-805}{+ let-805}$
1 Teil [Wildtyp]	2 Teile [Wildtyp]	1 Teil [†]

$\frac{t2732 +}{qC1 + dpy-19 glp-1} \quad \text{segregiert in....}$		
$\frac{qC1 + dpy-19 glp-1}{qC1 + dpy-19 glp-1}$	$\frac{t2732 +}{qC1 + dpy-19 glp-1}$	$\frac{t2732 +}{t2732 +}$
1 Teil [dpy]	2 Teile [Wildtyp]	1 Teil [Wildtyp]

Komplementiert *let-805(st456)* *t2732*, erwarten wir zu 50% Gelege mit *[dpy]*-Nachkommen und zu 50% Gelege mit einem Viertel toter Eier.

Möglichkeit B: *let-805(st456)* komplementiert NICHT *t2732*:

P:  $\frac{t2732}{t2732} \quad \times \quad \frac{let-805(st456) +}{qC1 + dpy-19(e1259) glp-1(q339)}$

F1:  $\frac{t2732}{let-805} \quad \frac{t2732 +}{qC1 + dpy-19 glp-1}$

$\frac{t2732}{let-805}$	segregiert in....	
$\frac{t2732}{t2732}$	$\frac{t2732}{let-805}$	$\frac{let-805}{let-805}$
1 Teil [+]	2 Teile [+]	1 Teil [+]

$\frac{t2732 \quad + \quad +}{qC1 \quad + \quad dpy-19 \quad glp-1}$	segregiert in....	
$\frac{qC1 \quad + \quad dpy-19 \quad glp-1}{qC1 \quad + \quad dpy-19 \quad glp-1}$	$\frac{t2732 \quad + \quad +}{qC1 \quad + \quad dpy-19 \quad glp-1}$	$\frac{t2732 \quad + \quad +}{t2732 \quad + \quad +}$
1 Teil [dpy]	2 Teile [Wildtyp]	1 Teil [Wildtyp]

Komplementiert *let-805(st456)* **NICHT** *t2732* erwarten wir zu 50% Gelege mit [dpy]-Nachkommen und zu 50% Gelege mit ausschließlich toten Eiern.

In 71,4% der analysierten Gelege traten in der F2-Generation [dpy]-Nachkommen auf. Die übrigen Gelege wurden ausgezählt: Es schlüpften insgesamt 1958 Larven und 402 (17%) Embryonen starben in ihrer Entwicklung. Dieses Ergebnis zeigt, dass *let-805(st456)* *t2732* komplementiert. Die temperatursensitive Mutation in *t2732* liegt folglich in *Y82E9BR.14* oder *M01G5.1*.

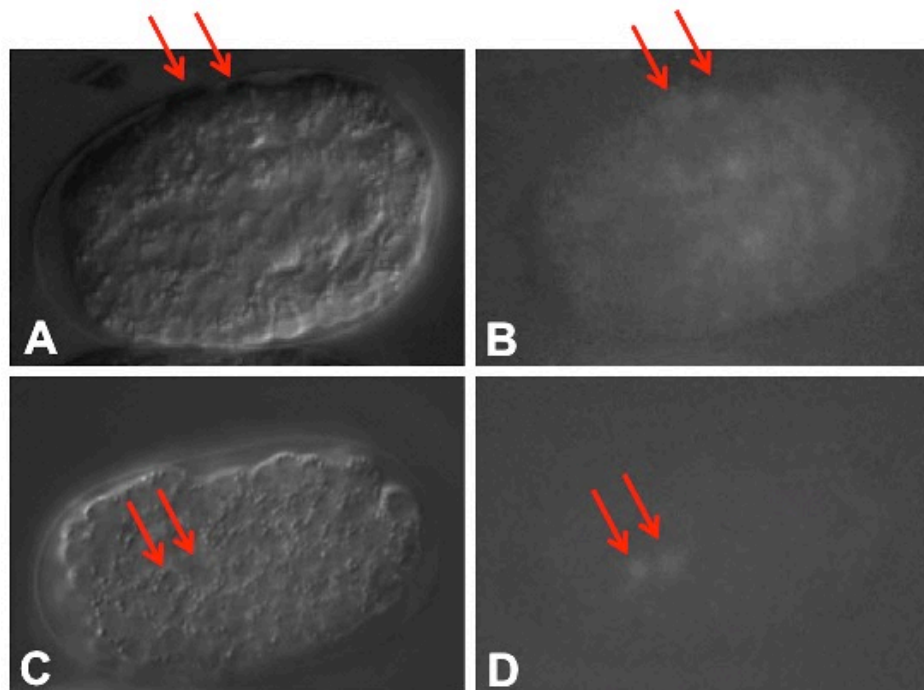
## Analyse des Knock-Out Stammes RB1184 mit dem Allel *ok1230* des Genes *Y82E9BR.14*

Der Stamm RB1184 ist laut *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) homozygot für eine ca. 500 bp große Deletion in dem Gen *Y82E9BR.14*. Phänotypisch ist dieser Stamm Wildtyp. Da keine genaue Position für die Deletion angegeben ist, wurde das Gen sequenziert: Das Allel *ok1230* hat eine Deletion von 740 bp im letzten Intron des Gens *Y82E9BR.14*. Eine 27 bp lange Sequenz hat sich an Stelle des deletierten Bereichs zusätzlich inseriert. Da sich diese Deletion ausschließlich im Intron befindet,

entspricht auch der Wildtyp-Phänotyp der Erwartung. Es wurden keine weiteren Arbeiten mit dem Stamm RB1184 durchgeführt.

### Analyse des Expressionsmuster der Kandidatengene mit Promoter-GFP-Fusionskonstrukten

Um die Expressionsmuster der Kandidatengene *M01G5.1* und *Y82E9BR.14* zu untersuchen, wurden Promotor-H2B::GFP-Fusionskonstrukte erstellt. Es sollte so überprüft werden, ob das Expressionsmuster der Gene dem Phänotyp von *t2732* entspricht (Abb. 50).



**Abb. 50: Expressionsanalysen der Kandidatengene *M01G5.1* und *Y82E9BR.14* mit Promotor-H2B::GFP-Fusionskonstrukten** (A) Normarski-Aufnahme eines Wildtyps, der mit dem Promotor-H2B::GFP-Fusionsprodukt von *M01G5.1* erfolgreich transformiert wurde. (B) Zugehöriger GFP-Scan. In zwei Zellen ließ sich Signal detektieren (Pfeil). (C) Normarski-Aufnahme eines Wildtyps, der mit dem Promotor-H2B::GFP-Fusionsprodukt von *Y82E9BR.14* erfolgreich transformiert wurde. (D) Zugehöriger GFP-Scan. In zwei Zellen ließ sich Signal detektieren (Pfeil).

Jana Zenk konnte im Zuge ihrer Bachelor-Arbeit erfolgreich drei stabile Linien mit dem Promotor-H2B::GFP-Fusionskonstrukt von *M01G5.1* im Wildtyp isolieren. Von 66 analysierten Embryonen zeigte nur einer Expression. Ein GFP-Signal ließ sich in den Zellen ABplaapppa und ABplaappppp detektieren (Zenk, 2012).

Sophie Ziegler untersuchte in ihrer Bachelorarbeit das Gen *Y82E9BR.14*. Die Transformation des Wildtyps mit dem Promoter-H2B:GFP-Fusionskonstrukt von *Y82E9BR.14* ergab drei stabile Linien. Es wurden 33 Embryonen mikroskopisch analysiert und in zwei Embryonen ein Signal detektiert: Es leuchteten einmal die Zellen ABpraaaa und ABpraaap und einmal die Zellen ABarapapa und ABarapapp (Ziegler, 2012).

Das Expressionsmuster beider Gene wäre unerwartet für den Phänotyp der temperatursensitiven Mutation in *t2732*. Durch die frühe temperatursensitive Phase, die vor dem Einzellstadium beginnt, lässt sich ein früher Expressionsbeginn vermuten. Da Adhäsions- und Migrationsdefekte sehr ubiquitär auftreten, sollte sich das GFP-Signal in einem Großteil der Zellen detektieren lassen. Es kann sich allerdings bei beiden untersuchten Genen um Mosaik-Expressionen halten. Dabei wird ein Array in der Embryogenese nicht an alle Zellen weitergegeben und auch nicht überall exprimiert. Es ist also durchaus möglich, dass das native Protein in Zellen exprimiert wird, die hier durch das Konstrukt nicht markiert werden. Es lässt sich daher keine Aussage darüber treffen, ob eines der Kandidatengene mit höherer Wahrscheinlichkeit für die temperatursensitive Mutation in *t2732* codiert.

## Stummschalten der Kandidatengene mittels RNA-Interferenz

Mit Hilfe der Technik der RNA-Interferenz (RNAi) lassen sich Gene stummschalten. Bringt man doppelsträngige RNA in eine Zelle ein, so vermutet diese einen viralen Angriff. Ein Enzymkomplex baut nun jegliche RNA mit dieser Sequenz ab – es wird folglich kein Genprodukt mehr gebildet. So lässt sich gezielt die Wirkungsweise einzelner Gene untersuchen. In *C. elegans* kann die doppelsträngige RNA sowohl direkt in die Gonade injiziert werden als auch über exprimierende Futter-Bakterien zugeführt werden. Mögliche Phänotypen lassen sich dann innerhalb der Nachkommen beobachten (Fire *et al.*, 1998; Kamath *et al.*, 2001).

Es sollte nun ermittelt werden, ob sich der Phänotyp von *t2732* bei restriktiver Temperatur mit dem RNAi eines Kandidatengens kopieren lässt. Sowohl *Y82E9BR.14* als auch *M01G5.1* wurden mit beiden Methoden im Wildtyp stummgeschaltet. Ein Phänotyp ließ sich nicht erkennen. Die Würmer legten gesunde und lebensfähige Nachkommen.

Es lässt sich nicht bestimmen, ob die Gene sich nicht mittels RNAi stummschalten lassen oder ob ein Verlust des Genproduktes keinen sichtbaren Phänotyp bewirkt. Es bleibt weiterhin unklar, ob die temperatursensitive Mutation in *Y82E9BR.14* oder *M01G5.1* liegt.

## Klonierung mittels biolistischer Transformation

Seit dem Beginn meiner Diplomarbeit wurde die Mutante *t2732* mit verschiedenen DNA-Fragmenten transformiert, um die genaue Position und schlussendlich die Identität der temperatursensitiven Mutation zu ermitteln.

Als interne Kontrolle, dass die Mutante *t2732* in der Lage ist Fremd-DNA aufzunehmen und stabil an seine Nachkommen weiterzugeben, wurde eine Transformation mit dem spezifischen Pharynx-Marker pPD118.33ΔΔmCherry durchgeführt. In einem Transformationsexperiment wurden zuerst viermal Wildtyp-Würmer mit dem Marker transformiert. Im identischen Ansatz wurde dann viermal die Mutante *t2732* transformiert.

Aus 122 transformierten Wildtyp-Würmern ließen sich fünf unabhängige stabile Linien gewinnen. Im Ansatz der Mutante wurden 204 transformierte Würmer vereinzelt und es entstanden fünf unabhängige stabile Linien (Tabelle 11).

*t2732* ist folglich transformierbar und kann Arrays stabil an seine Nachkommen weitergeben.

**Tabelle 11: Test auf Transformierbarkeit der Mutante *t2732***

	vereinzelte Transformanten	stabile Linien	Anteil stabiler Linien [%]
Wildtyp N2	122	5	4
<i>t2732</i>	204	5	2,4

Da zu Beginn dieses Projektes nur die Ergebnisse des konventionellen SNP-Mappings vorlagen, wurde die Mutante *t2732* mit verschiedenen YACs, Fosmiden und PCR-Produkten, die den linken Arm von Chromosom III abdecken, transformiert. Die Tabelle 12 zeigt die verschiedenen Fragmente, die sich von 0 - 7 MB auf Chromosom III erstrecken.



**Tabelle 12: Verschiedene Transformationen zur Komplementierung von *t2732***

Name	Anzahl Transformationen	Name	Anzahl Transformationen
WRM066cC11	16	Y22D7	24
WRM0640bB07	40	Y46E12	24
Y66A10	24	Y39A3	24
Y25F5	24	Y48G9	24
Y43B10	16	Y54E10	16
Y50D7	16	Y71H2	24
Y55B1	24	WRM0627cH07	16
Y51H3	16	Y55D5	8
Y43D9	32	Y53G8	8
Y53D4	24	Y63D1	16
Y52E3	24	Y68C4	16
Y7G10	32	Y43E9	8
WRM0621cA05	8	Y6C11	8
WRM0627aA03	8	Y56B12	8
WRM0621aD02	8	Y47H5	8
Y34F4	24	Y61H12	8
WRM0621aE03	8	Y50C3	8
Y92C3	16	Y101D2	8
Y11F11	24	Y44H9	8
Y71D11	16	Y46B10	8
Y119D3	24	Y44C12	8
Y82E9	40	Y39G1	8
Y82E9BR.14-DNA	32	Y59D2	8
Y82E9BR.14	16	Y52C3	16
M01G5.1	16	Y102E9	16
Y67D2	32	Y68D5	16

Die Kandidatengene, aus dem Whole-Genome-Sequencing wurden insgesamt häufiger transformiert:

*Y82E9BR.14* wurde als YAC, PCR-Produkt und als Plasmid insgesamt 88mal in die Mutante *t2732* transformiert.

*M01G5.1* liegt auf den YACs Y82E9 und Y67D2. Es wurden sowohl mit YACs als auch mit einem Plasmid insgesamt 88 Komplementationsversuche durchgeführt.

Da *let-805* durch den Komplementationstest ausgeschlossen wurde, wurden nur 24 Komplementationsversuche mit dem YAC Y71H2 durchgeführt.

Eine Rettung der temperatursensitiven Mutation ließ sich mit keinem Fragment etablieren!

Es stellt sich nun die Frage, ob *t2732* synthetisch ist. Das konservative SNP-Mapping ergab Kopplungen an die Bereiche -26,98, -10,04 und -4,6 auf Chromosom III. Die Gene *Y82E9BR.14* und *M01G5.1* liegen nun bei ungefähr -21,8 und *let-805* bei -10,95 auf der genomischen Karte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich der Phänotyp von *t2732* aus zwei oder mehr Mutationen zusammensetzt und deswegen keine erfolgreiche Komplementation durch biolistische Transformation stattfand. Dies wäre unerwartet, da eigentlich davon auszugehen ist, dass sich ein synthetischer Phänotyp aufheben lässt, wenn man eines der betroffenen Gene erfolgreich komplementiert. Zur Überprüfung wurden verschiedene DNA-Gemische transformiert. Die Mutante *t2732* wurde 32mal mit der genomischen DNA des Wildtyps transformiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die DNA von guter Qualität war und besonders vorsichtig isoliert wurde. Eine Rettung ließ sich nicht etablieren. Es wurden außerdem DNA-Gemische mit allen drei Kandidatengenen überprüft. Hierzu wurden achtmal die YACs Y82E9 (enthält *Y82E9BR.14* und *M01G5.1*) und Y71H2 (enthält *let-805*) gemeinsam transformiert. Allerdings ließen sich keine temperaturtoleranten Linien etablieren. Auch die Transformation des PCR-Produktes von *Y82E9BR.14*, des Plasmids mit *M01G5.1* und des YACs Y71H2 (*let-805*) komplementierten *t2732* nicht. Ein synthetischer Phänotyp lässt sich nicht bestätigen und bleibt unwahrscheinlich. Das Gen hinter der temperatursensitiven Mutation in *t2732* bleibt unbekannt.

## Charakterisierung des Phänotyps von *t2732*

Da im Zuge meiner Diplomarbeit erste Unstimmigkeiten zwischen dem beobachteten und von Hintze beschriebenen Phänotyp von *t2732* aufgefallen sind, wurde eine komplette neue Charakterisierung angefertigt.

### Verhalten von *t2732* bei permissiver und restriktiver Temperatur

Bei der permissiven Temperatur lässt sich *t2732* problemlos anziehen. Ein Hermaphrodit hatte im Schnitt 210 +/- 33 lebende Nachkommen. Außerdem wurden noch 46 +/- 34 Oozyten abgelegt. In einem parallel laufenden Kontrollansatz hatte ein Wildtyp-Hermaphrodit 237 +/- 41 Nachkommen und legte 35 +/- 25 Oozyten ab.

**Tabelle 13: Vergleich der Gelegegröße von N2 und *t3219* bei permissiver Temperatur**

	Nachkommen	Oozyten
N2	237 +/- 41	35 +/- 25
<i>t2732</i>	210 +/- 33	42 +/- 30

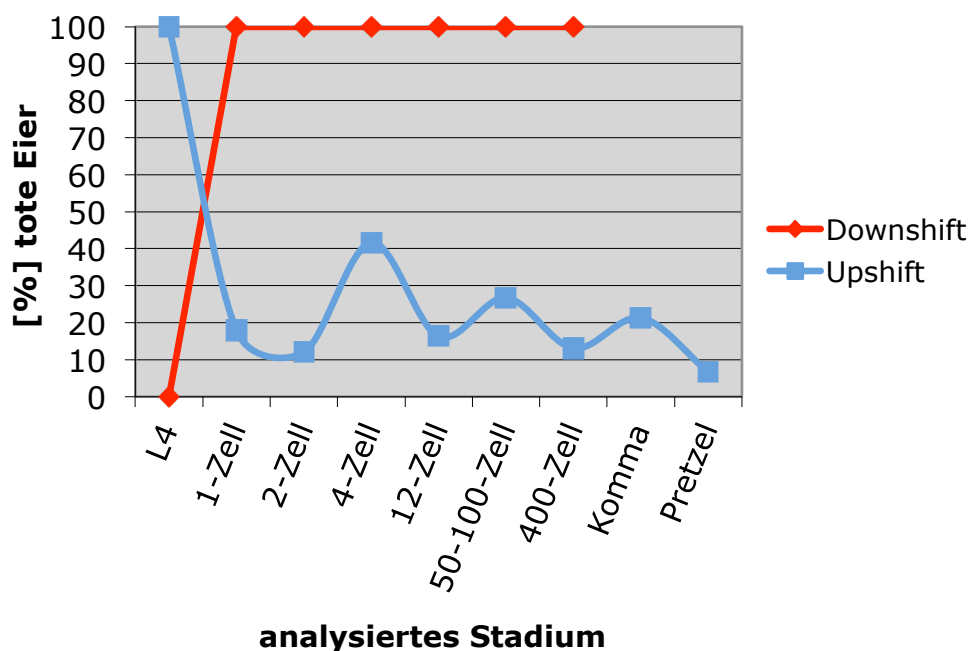
Bei der restriktiven Temperatur ist *t2732* strikt temperatursensitiv. Hermaphroditen, die im L4-Stadium auf die restriktive Temperatur gebracht wurden, legten im Mittel 73 +/- 30 tote Eier und 27 +/- 24 Oozyten ab.

### *t2732* wirkt maternal

Transkripte maternaler Gene müssen dem Embryo von der Mutter zur Verfügung gestellt werden. Dies unterscheidet sie von zygotischen Genen, die im Zuge der Embryonalentwicklung nur vom Embryo selbst exprimiert werden. Um zu analysieren, ob *t2732* maternal vererbt wird, wurde die Mutante mit Wildtyp-Männchen gekreuzt. L4-Larven der heterozygoten F1-Generation wurden auf die restriktive Temperatur gebracht (n=10) und haben dort im Mittel 135 +/- 27 lebende Nachkommen und 2 +/- 3 tote Eier abgelegt. Die Nachkommen wurden vereinzelt (n=30) und weiter bei der restriktiven Temperatur inkubiert. 16,6 % legten nur tote Eier ab. *t2732* wirkt folglich maternal.

## Die embryonale temperatursensitive Phase von *t2732*

Da *t2732* eine temperatursensitive Mutante ist, lässt sich das Genprodukt durch Wechsel von restriktiver und permissiver Temperatur in- bzw. reaktivieren. Eine (In)Aktivierung zu verschiedenen Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung gibt nun Auskunft darüber, wann das Genprodukt in der Embryogenese benötigt wird. Im Zuge dieses Experimentes wurden Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien für den sogenannten Downshift von der restriktiven auf die permissive Temperatur gebracht ( $n=40$ ) und für den sogenannten Upshift von der permissiven auf die restriktive Temperatur gebracht ( $n=60$ ). Nach 48 h wurde die Anzahl der geschlüpften und lebenden Würmer ermittelt und graphisch dargestellt (Abb. 51). Das Genprodukt scheint sehr früh, bereits vor dem 1-Zell-Stadium benötigt zu werden. Solch eine embryonale temperatursensitive Phase wurde auch von Hintze beschrieben (Hintze, 2007). Da die Embryogenese zu diesem Zeitpunkt mit Transkripten maternaler Gene gesteuert wird (Baugh *et al.*, 2003), geht dies mit der beobachteten maternalen Wirkung von *t2732* konform. Da sich allerdings erste Defekte in der Mutante erst deutlich später zeigen, ist diese temperatursensitive Phase trotzdem unerwartet.



**Abb. 51: Embryonale temperatursensitive Phase von *t2732*.** Auf der Ordinate sind die einzelnen untersuchten Stadien der Embryogenese aufgetragen. Der prozentuale Anteil der toten Eier ist auf der Abszisse aufgetragen. Die blaue Kurve zeigt den Wechsel von permissiver auf restriktive Temperatur (Upshift) und die rote Kurve zeigt den Wechsel von restriktiver auf permissive Temperatur (Downshift). Die Kurven schneiden sich vor dem Einzellstadium. Das Genprodukt wird zu diesem Zeitpunkt benötigt.

Es lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass die temperatursensitive Mutation *t2732* frühe Fehler in der Embryogenese verursacht, die in der späteren Entwicklung die augenscheinlichen Defekte in der Zelladhäsion zur Folge haben.

Als weitere Hypothese lässt sich hier anführen, dass es sich um einen temperatursensitiven Effekt in der Proteinbiosynthese handeln könnte. Dabei wäre bei der restriktiven Temperatur keine korrekte Synthese des Proteins möglich. Auch bei einem Wechsel auf die permissive Temperatur bleibt das Protein dann funktionslos. Wenn nun schon früh in der Embryogenese ein Vorrat dieses Proteins synthetisiert wird, kann dies im Zuge des Downshifts nicht mehr renaturieren. Dem Embryo steht dann kein oder zu wenig funktionsfähiges Protein zu Verfügung und er stirbt im Laufe der Entwicklung.

### Zelllinienanalysen von *t2732*

Fünf verschiedene Embryonen von *t2732* wurden mit SIMI° Biocell analysiert. Alle starben am Ende der Aufnahme in einem chaotischen Zustand. Die Embryogenese eines Wildtyp-Embryos wird mit 750 Scans (ca. 7 h) aufgenommen. *t2732* entwickelt sich ab der siebten Teilungsrunde langsamer und wird ab der achten Teilung stark asynchron. Daher wurden mindestens 1000 Scans (ca. 10 h) aufgenommen und analysiert.

Entgegen der früheren Beobachtungen von Hintze waren die Schicksale in *t2732* inkorrekt (Tab.14)! Die 14 Zelltode waren bis auf wenige Ausnahmen in keinem Embryo vorhanden. Die Zellen traten nicht in die Apoptose ein oder teilten sich zusätzlich. In einigen Fällen hat sich auch die Mutterzelle nicht geteilt, so dass Zellen, die im Wildtyp sterben, in *t2732* gar nicht entstanden. In allen Embryonen traten zusätzliche Zelltode auf. Diese entstanden an verschiedenen Positionen in der Zelllinie. Anterior-Posterior-Transformationen, die auf einen Schicksalsdefekt durch falsche frühe Induktion hindeuten würden (vgl. *glp-1*), traten nicht auf. In zwei Embryonen ließ sich die exkretorische Zelle nachweisen. Im Embryo *t2732\_2* teilte sie sich zusätzlich und in den Embryonen *t2732\_3* und *t2732\_5* entstand sie nicht, da die Mutterzelle sich nicht mehr teilte. Die Zellen der Hypodermis und des Darms entwickelten sich ebenfalls nicht korrekt. Dabei fiel auf, dass der Embryo *t2732\_2* überwiegend Hypodermiszellen mit korrektem Schicksal besaß. Der Phänotyp trat hier unterschiedlich intensiv auf.

**Tabelle 14: Überprüfung prägnanter Zellschicksale in fünf Embryonen von t2732 bei restriktiver Temperatur mittels SIMI° Biocell**

	t2732_1	t2732_2	t2732_3	t2732_4	t2732_5
CD # 1	fehlt	+	fehlt	+	fehlt
CD # 2	Teilung	Teilung	fehlt	fehlt	fehlt
CD # 3	fehlt	fehlt	fehlt	Teilung	fehlt
CD # 4	fehlt	Teilung	Keine Teilung d. Mutter	Teilung	fehlt
CD # 5	fehlt	+	Teilung	fehlt	fehlt
CD # 6	Teilung	+	Teilung	fehlt	fehlt
CD # 7	Teilung	Teilung	fehlt	Teilung	fehlt
CD # 8	Teilung	fehlt	fehlt	fehlt	Teilung
CD # 9	Teilung	fehlt	Keine Teilung d. Mutter	fehlt	fehlt
CD # 10	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
CD # 11	fehlt	fehlt	Teilung	Teilung	fehlt
CD # 12	fehlt	fehlt	Teilung	fehlt	Keine Teilung d. Mutter
CD # 13	Keine Teilung d. Mutter	+	fehlt	Keine Teilung d. Mutter	fehlt
CD MS	Teilung	Teilung	Teilung	Teilung	Teilung
Exkret. Zelle	+	Teilung	Keine Teilung d. Mutter	+	Keine Teilung d. Mutter
V1L	Teilung	+	+	+	+
V2L	+	+	+	+	+
V4L	Teilung	+	Keine Teilung d. Mutter	Teilung	nicht sichtbar
V6L	Teilung	+	Keine Teilung d. Mutter	Teilung	+
V1R	Teilung	+	Keine Teilung d. Mutter	Keine Teilung d. Mutter	nicht sichtbar
V2R	Teilung	+	Keine Teilung d. Mutter	Keine Teilung d. Mutter	nicht sichtbar
V4R	Teilung	+	Teilung	Teilung	nicht sichtbar
V6R	Teilung	+	Teilung	Teilung	nicht sichtbar
H2R	Teilung	+	+	+	Teilung
H2L	Teilung	+	Teilung	+	+

G2	Teilung	+	Teilung	+	Teilung
TL	nicht sichtbar	+	+	Teilung	Teilung
TR	nicht sichtbar	Teilung	Teilung	Teilung	+
Eplpa	Teilung	Teilung	Teilung	+	Teilung
Eplaa	Teilung	Teilung	Teilung	Teilung	Teilung
Eprppp	Teilung	+	nicht sichtbar	Keine Teilung d. Mutter	nicht sichtbar
Capaaa	+	+	+	Keine Teilung d. Mutter	Keine Teilung d. Mutter
Z2	+	+	+	+	Teilung
zusätzliche CDs	ABalaapaaa ABalpaapaa	ABalaaapar ABalaapppa ABalpaapaa ABalpapapaa ABalpapapp ABarpaaapa MSpppapa	ABarpapaaa MSapappp	ABalaaaal ABalaapaap ABalappapaa ABplaappaa	ABarapppap ABarpaaaaa MSpppap

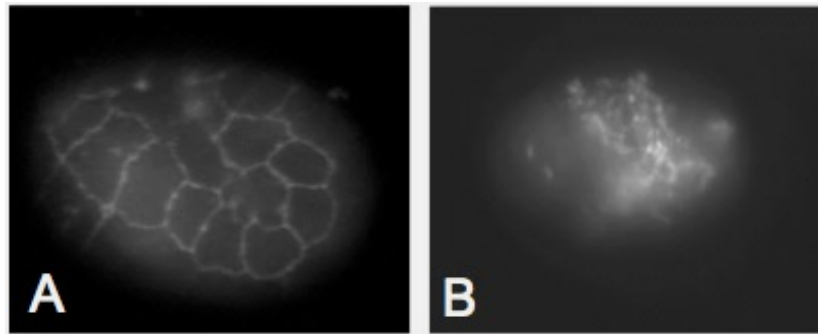
Die Zellen in *t2732* haben einen Defekt im Zellschicksal. Es scheinen Zellen aller Regionen betroffen zu sein. Definierte Transformationen lassen sich nicht erkennen. Da in den 4D-Aufnahmen Probleme in der Adhäsion zu erkennen waren (Abb. 43 B), ist ein Schicksalsdefekt nicht unerwartet. Induktionen für Zellschicksale sind von korrekter Zell-Zell-Kommunikation und folglich auch von korrekter Zelladhäsion abhängig. Ist dieser Kommunikationsweg gestört, weichen auch vermutlich die Schicksale vom Wildtyp ab.

### Immunhistochemische Analyse der Gewebedifferenzierung

Die Mutante *t2732* stirbt bei der restriktiven Temperatur als chaotischer und ungeordneter Zellhaufen. In welchem Maße dabei noch eine Differenzierung der verschiedenen Gewebe auftritt, sollte durch eine immunhistochemische Analyse mit verschiedenen Antikörpern analysiert werden. So konnten auch weitere Erkenntnisse über die Schicksale der Zellen im Embryo gewonnen werden.

### Epidermale Differenzierung

Die Desmosomen im Embryo werden durch den Antikörper MH27 detektiert. So lassen sich Aussagen über die Organisation von Hypodermis-, Pharynx- und Darmzellen in der Embryogenese treffen. Im Wildtyp (Abb 52 A) erkannte man deutlich die Hypodermiszellen und Zellen des Pharynx. In der Mutante lagen die Zellen ohne jegliche Ordnung im Embryo verteilt und bildeten keine typische Hypodermis (Abb. 52 B). Dies entspricht den Ergebnissen der Zelllinienanalysen. Die dort untersuchten Hypodermiszellen V1L, V2L, V4L, V6L, V1R, V2R, V4R, V6R, H2R, H2L, G2, TL und TR fehlten teilweise oder teilten sich erneut. Eine intakte Hypodermis bildete sich nicht.

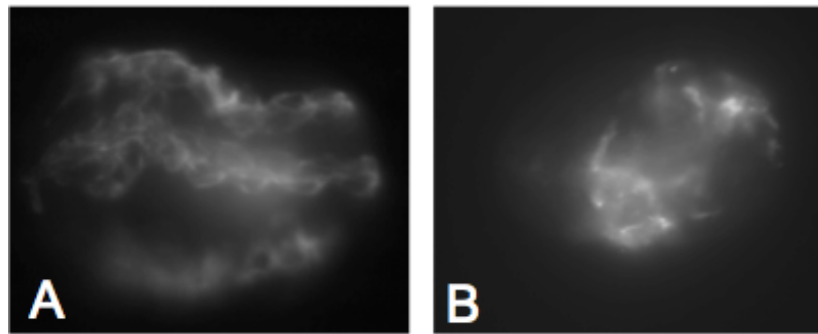


**Abb. 52: Immunhistochemische Färbung der Desmosomen** (A) Im Wildtyp erkannte man deutlich die Struktur der Hypodermis. (B) Bei der restriktiven Temperatur waren die Zellen in der Mutante *t2732* chaotisch verteilt.

### Differenzierung des Körpermuskels

Der Antikörper 5-6 färbt die 81 Körpermuskel-Zellen in *C. elegans*. Im Wildtyp erkannte man deutlich die Bänder in denen sich die Muskelzellen anordnen (Abb. 53 A). Die Färbung der Mutante zeigte hingegen ein komplett anderes Bild. Die Zellen lagen unstrukturiert und ungeordnet im Embryo (Abb. 53 B). Es ließen sich 52 +/- 7 Zellen zählen (n=20). Dies steht in deutlicher Diskrepanz zu den 81 gefärbten Zellen im Wildtyp. Die Zelllinienanalyse hat gezeigt, dass die Schicksale in der Mutante *t2732* gestört sind und die Zellen ohne Ordnung im Embryo liegen. Diese Hypothese lässt sich mittels dieser Färbung bestätigen.



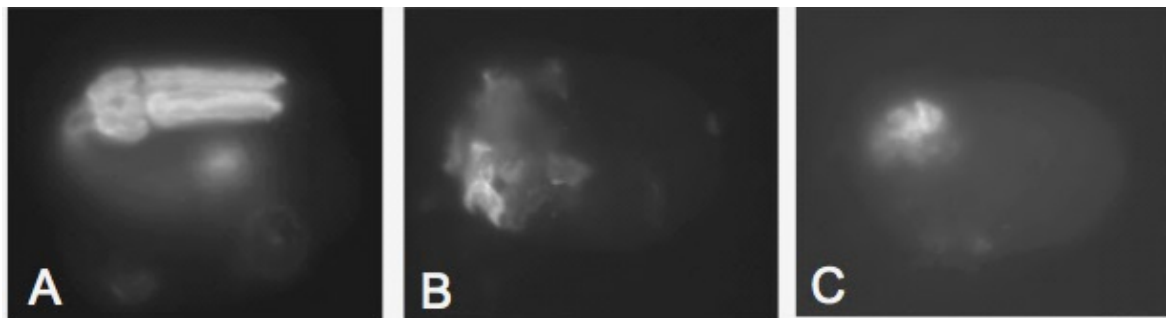


**Abb. 53: Immunhistochemische Färbung des Körpermuskels** (A) Im Wildtyp erkannte man deutlich die 81 Zellen des Körpermuskels. (B) In der Mutante *t2732* waren bei der restriktiven Temperatur zu wenig Zellen gefärbt. Sie lagen ungeordnet im Embryo.

### Differenzierung der Pharynxstruktur

Die Struktur des Pharynx lässt sich mittels des Antikörpers 3NB12 darstellen. Dieser bindet spezifisch an die Glykoproteine des Pharynx und färbt im Wildtyp 21 Pharynx-Zellen und vier Neuronen (Abb. 54 A). Die typische Pharynxstruktur war klar erkennbar. In *t2732* zeigten sich verschieden stark mutante Strukturen ( $n=21$ ).

Es waren deutlich zu wenig Zellen angefärbt ( $14 \pm 4$ ) und es war kein Pharynx zu erkennen (Abb. 54 B). Es ließ sich auch eine sehr starke Ausprägung des mutanten Phänotyps mit nur 6 detektierten Zellen finden (Abb. 54 C).



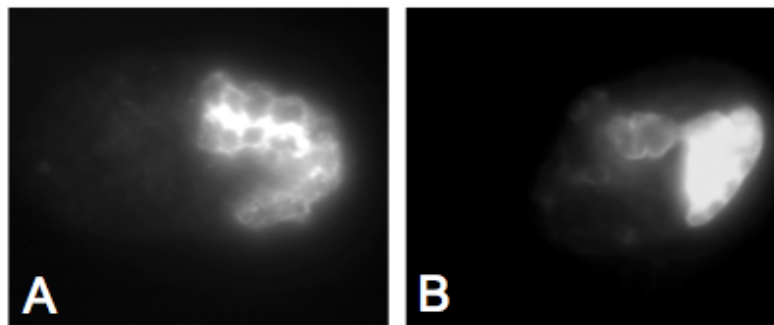
**Abb. 54: Immunhistochemische Färbung der Pharynxstruktur** (A) Im Wildtyp war deutlich der Pharynx zu erkennen. (B) In *t2732* bildet sich bei restriktiver Temperatur kein Pharynx aus. (C) Stark mutante Pharynxstruktur mit nur sechs gefärbten Zellen.

Die mutanten Phänotypen bestätigen die Ergebnisse der 4D-Aufnahmen. Es ließ sich keine intakte Pharynxstruktur erkennen.

### Darmdifferenzierung

Im Wildtyp-Embryo detektiert der Antikörper ICB4 die Darmzellen, sechs bis acht Neuronen und drei Drüsenzellen. Insgesamt werden 20 Zellen gefärbt und man erkennt deutlich die Struktur des Darms (Abb. 55 A). Die Mutante *t2732* bildete diese

Struktur zwar nicht aus, allerdings wurden  $20 \pm 1$  gefärbte Zellen gezählt (Abb. 55 B) ( $n=20$ ). Dies widerspricht den Ergebnissen der Zelllinienanalyse. Bei zwei Dritteln der dort untersuchten Darmzellen traten zusätzliche Teilungen auf. Eine mögliche Erklärung ist, dass nach der zusätzlichen Teilung eine Schwesterzelle weiterhin vom Antikörper detektiert wurde, während die andere Schwesterzelle nicht markiert wurde. Es ist auch möglich, dass sich andere Darmzellen zu selten teilten und so die Gesamtzahl doch mit dem Wildtyp übereinstimmte.



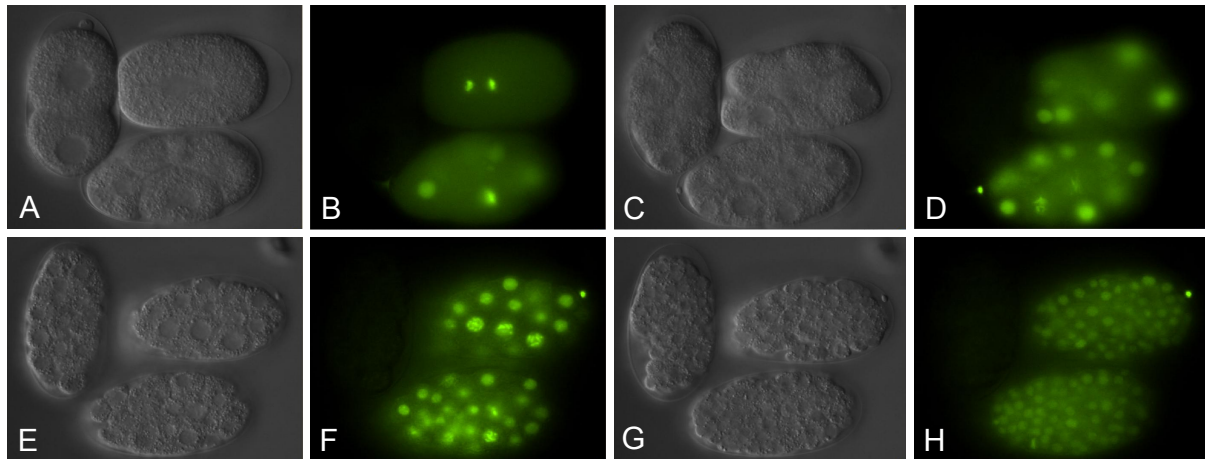
**Abb. 55: Immunhistochemische Färbung der Darmstruktur** (A) Im Wildtyp wurden deutlich erkennbar die Zellen des Darms detektiert. (B) In der Mutante *t2732* wurden bei restriktiver Temperatur Darmzellen gefärbt. Es bildete sich keine typische Darmstruktur aus.

Die Beobachtungen im Zuge der Immunofluoreszenz-Analyse bestätigten die Aussagen der Zelllinien-Analyse: Die Schicksale in *t2732* sind vollständig gestört und die Zellen liegen planlos verteilt im Embryo.

### Die DNA-Integrität in *t2732* scheint normal zu sein

Der Zellzyklus während der Embryonalentwicklung ist in der Mutante *t2732* bei restriktiver Temperatur sehr asynchron. Im Wildtyp teilen sich die einzelnen Zellen der AB-Zelllinie in der Embryonalentwicklung synchron zu fast identischen Zeitpunkten. In der Mutante *t2732* teilten sich die Zellen ab der achten Teilungsrunde asynchron. Einige Zellen durchliefen noch die neunte und eventuell zehnte Teilungsrunde, während andere Zellen in der achten Teilungsrunde verharrten. Ein definierter Zeitpunkt für die achte und neunte Zellteilungsrunde ließ sich nicht festlegen. Da in früheren Arbeiten im Schnabel-Labor (von Elsner, 2008) eine Mutante mit einem DNA-Defekt einen Zellzyklus-Phänotyp aufwies, wurde auch bei *t2732* die DNA-Integrität überprüft. Dazu wurde die temperatursensitive Mutante *t2732* mit einem Stamm gekreuzt, in dem das Gen für das Histon H2B, fusioniert mit GFP, unter dem *pie-1*-Promoter integriert ist. So ließ sich die Struktur der DNA in der

frühen Embryonalentwicklung unter dem 4D-Mikroskop verfolgen (Abb. 56). Die DNA war über das GFP-gekoppelte Histon gut sichtbar. In Zellen, die kurz vor der Teilung standen, erkannte man deutlich einzelne Chromosomen. Teilte sich eine Zelle (Abb. 56 B oben) erkannte man deutlich, wie die Chromosomen zu den Spindeln gezogen wurden. Es waren weder Bruchstücke noch DNA-Brücken zu erkennen. Die DNA-Integrität scheint bei *t2732* bei restriktiver Temperatur normal zu sein.



**Abb. 56: 4D-Aufnahme von *t2732*-Embryonen mit integriertem Histon::GFP** (A),(C),(E),(G) Normarski-Aufnahme von *t2732*-Embryonen mit integriertem Histon::GFP im Verlauf der Embryonalentwicklung (B),(D),(F),(H) zugehöriger GFP-Scan der *t2732*-Embryonen mit integriertem Histon::GFP. Die DNA war deutlich zu erkennen. Es ließen sich weder Bruchstücke noch DNA-Brücken detektieren.

## Bioinformatische Analyse von *t2732*

### Visualisierung der Zellpositionen mit Distanzkarten

Die Mutante *t2732* wurde mit dem bioinformatischen Programm Phainothea, das von Schnabel und Hennig entwickelt wurde, näher analysiert. So sollen neue Erkenntnisse über das Fehlverhalten der Zellen gewonnen werden. Leider ließen sich die bioinformatischen Analysen nicht im vollen Umfang für *t2732* durchführen. Die Embryonen der Mutante werden ab der achten Zellteilungsrunde stark asynchron und es ist nicht möglich ein 256-AB-Zellstadium zu definieren. So lässt sich weder ein Consensus-*t2732*-Embryo ermitteln, noch kann man für jeden Embryo Distanzkarten erstellen (siehe Abschnitt „Bioinformatische Analyse von *let-19(t3219)*“). Allerdings ließ sich für alle Embryonen der RMS-Wert berechnen. So

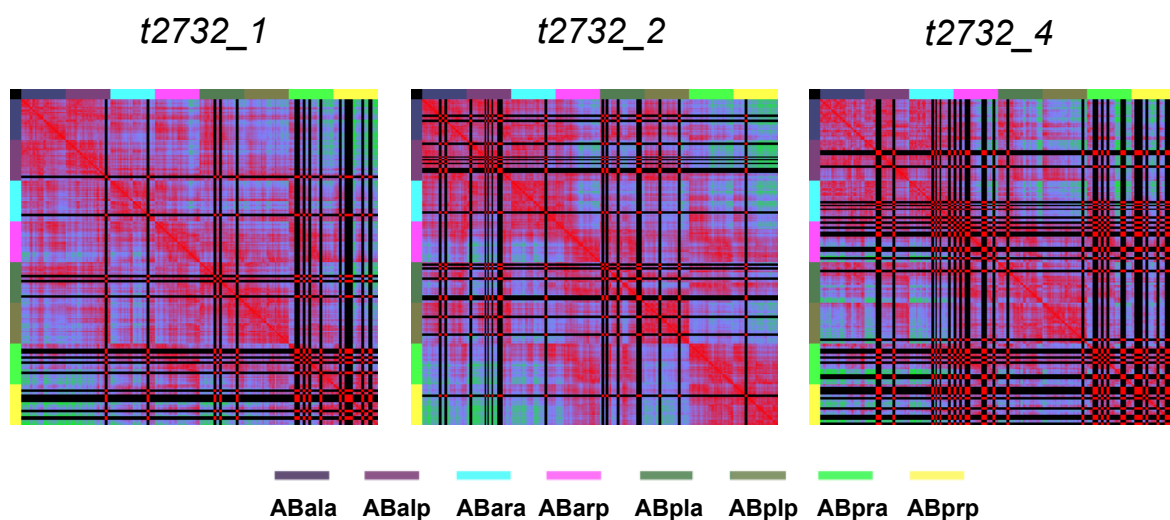
lässt sich ein erster Eindruck über falsche Zellpositionierung in der Mutante gewinnen (Tab. 15).

**Tabelle 15: Vergleich von verschiedenen *t2732*-Embryonen mittels RMS-Wert**

	<i>t2732_1</i>	<i>t2732_2</i>	<i>t2732_3</i>	<i>t2732_4</i>	<i>t2732_5</i>	Consensus_N2
<i>t2732_1</i>	0	0,15	0,14	0,16	0,16	0,18
<i>t2732_2</i>	0,15	0	0,15	0,15	0,15	0,17
<i>t2732_3</i>	0,14	0,15	0	0,15	0,15	0,175
<i>t2732_4</i>	0,16	0,15	0,15	0	0,16	0,16
<i>t2732_5</i>	0,16	0,15	0,15	0,16	0	0,173

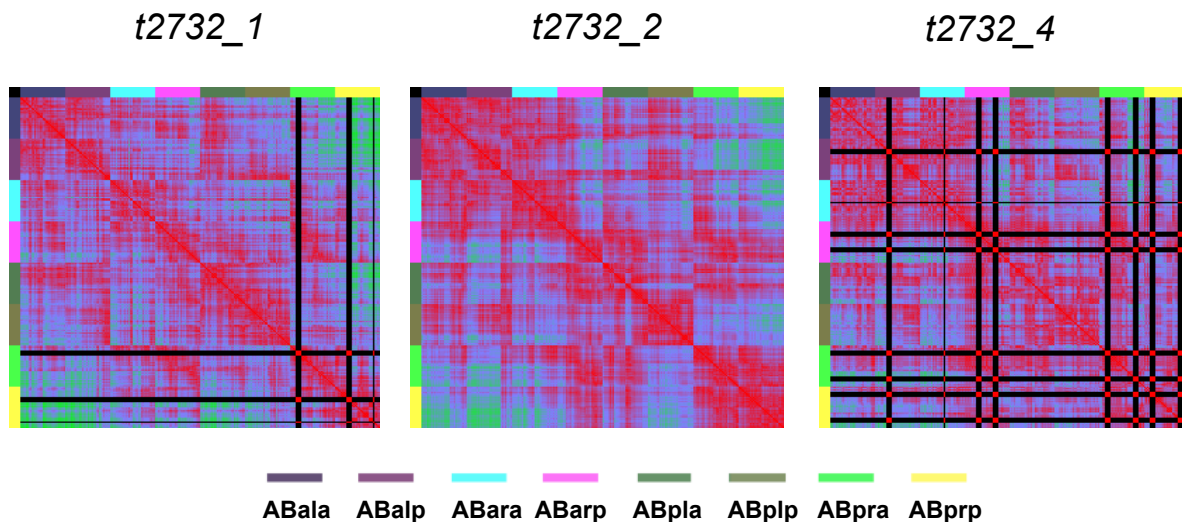
Vergleicht man die Zellposition in zwei Wildtypen ergibt sich ein RMS-Wert von 0,05. Da sich innerhalb der analysierten Embryonen von *t2732* RMS-Werte von 0,14-0,16 ergeben, erkennt man deutlich, dass sich die Zellen in den Mutanten ohne übergeordnetes Muster fehlerhaft sortieren. Einen noch höheren Fehler zeigt der RMS-Wert, wenn man die einzelnen analysierten Mutanten mit dem Consensus-Wildtyp vergleicht. Hier erhält man Werte von 0,16 – 0,175. Die Zellen in der Mutante scheinen sich überhaupt nicht im Wildtyp-Muster anzuordnen.

Es war möglich für die drei Embryonen *t2732\_1*, *t2732\_2* und *t2732\_4* Distanzkarten zu berechnen (Abb. 57). Durch die asynchrone Entwicklung fehlen Zellen – das Programm stellt sie als schwarze Streifen in der Distanzkarte dar.



**Abb. 57: Distanzkarten verschiedener *t2732*-Embryonen.** Da das Zellteilungsmuster nach der achten Teilungsrunde sehr asynchron wird, lässt sich kein Zeitpunkt mit 256 AB-Zellen bestimmen. Fehlende Zellen werden durch schwarze Streifen ersetzt.

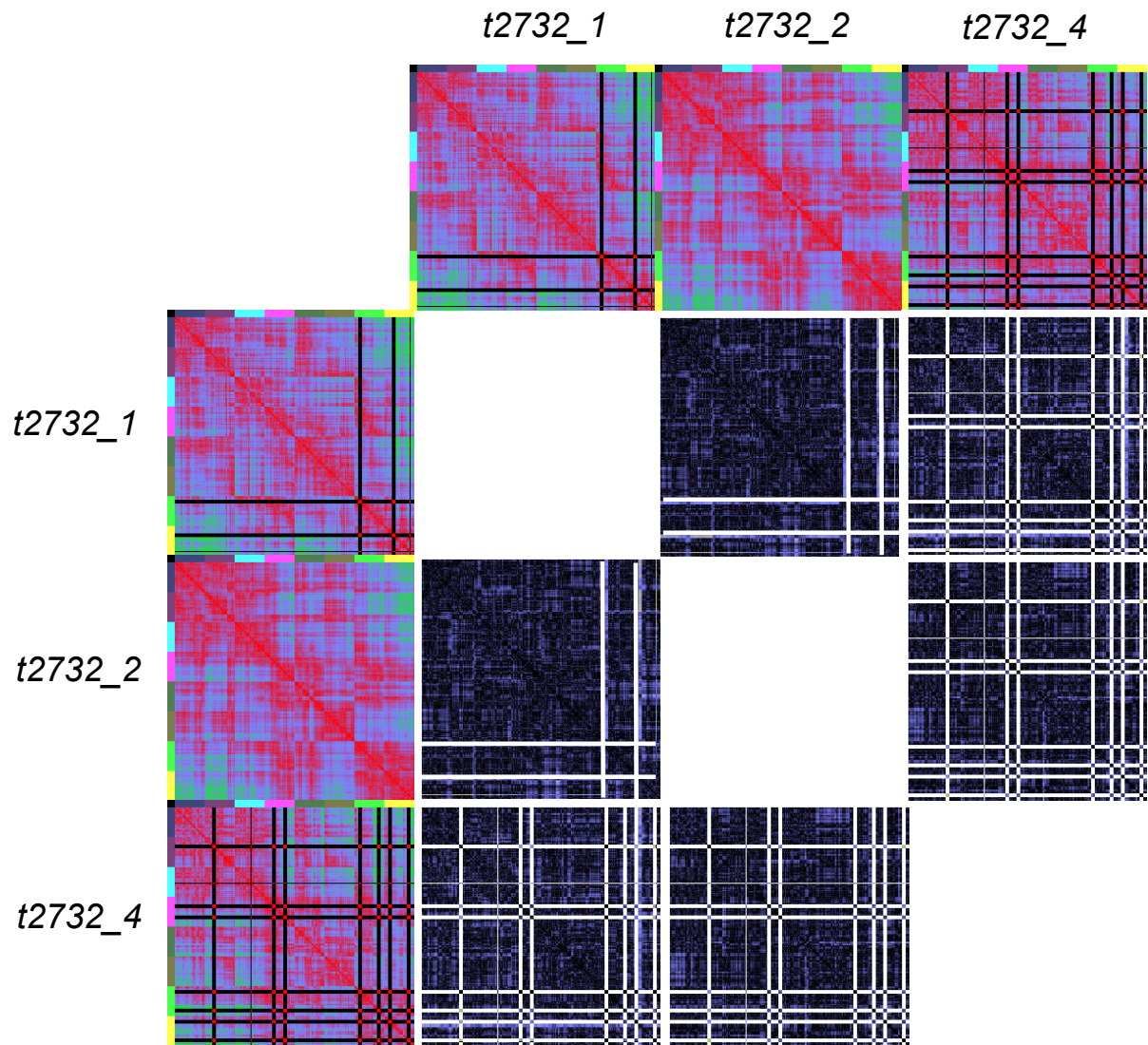
Durch die schwarzen Streifen wirken die Distanzkarten sehr unruhig. Vergleiche mit Wildtyp lassen sich so nicht mehr ohne weiteres durchführen. Abhilfe schaffen hier modifizierte Distanzkarten. Fehlt eine Zelle, werden die Daten ihrer Schwesterzelle gedoppelt und eingesetzt (Abb. 58). Diese Distanzkarten sind nun zwar ungenauer, lassen sich aber deutlich besser bearbeiten. Fehlen im Embryo allerdings zu viele Zellen, bleiben auch in der modifizierten Distanzkarte schwarze Streifen.



**Abb. 58: Modifizierte Distanzkarten verschiedener *t2732*-Embryonen.** Wenn möglich wurden die Daten fehlender Zellen mit den Daten der Schwesterzelle ersetzt.

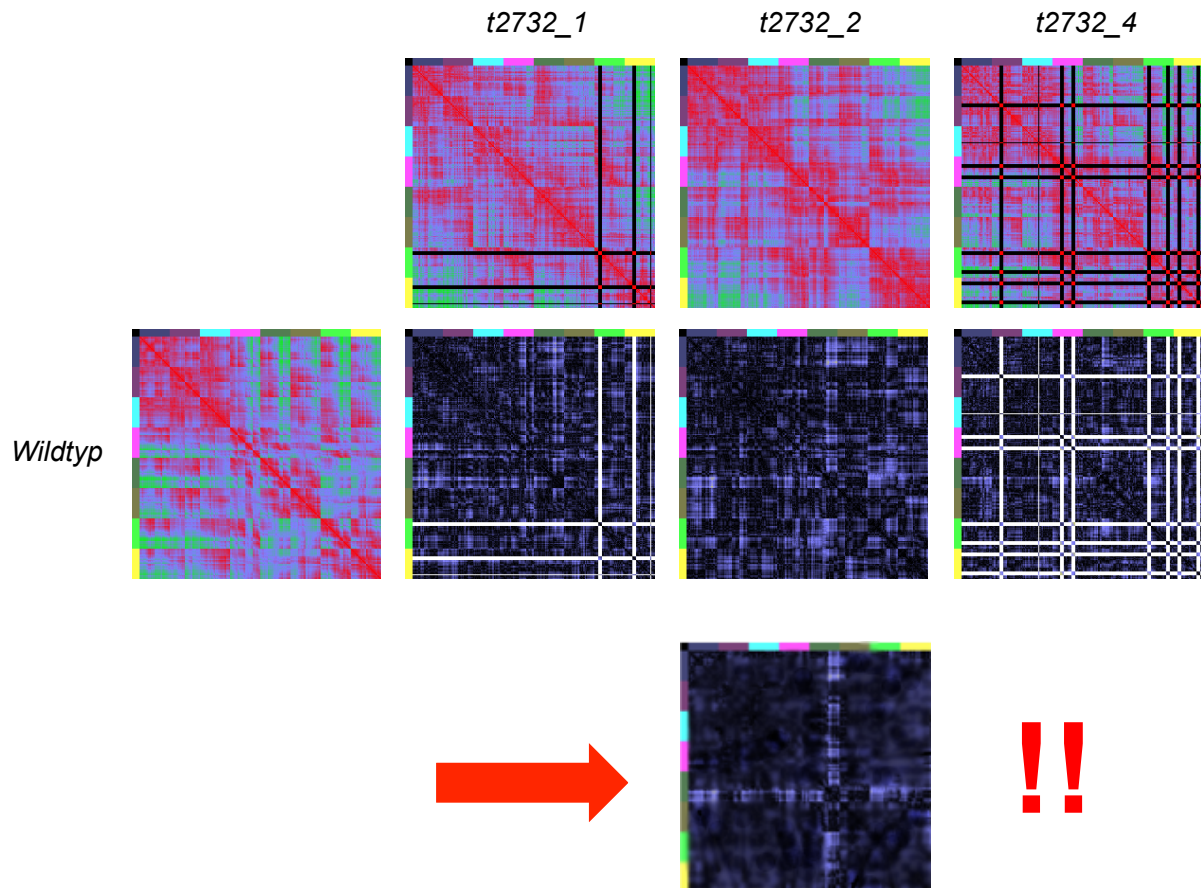
Vergleicht man diese Distanzkarten untereinander, so erhält man Differenzkarten (vergleiche Abschnitt „Bioinformatische Analyse von *let-19(t3219)*“) mit diffus verteilter Helligkeit (Abb. 59). Innerhalb der Embryonen gibt es starke Unterschiede innerhalb der Zellposition. Diese betreffen aber alle Regionen im Embryo gleichmäßig. Durch die Störsignale der fehlenden Zellen und der geringen Stichprobengröße ist es unmöglich Muster zu erkennen.





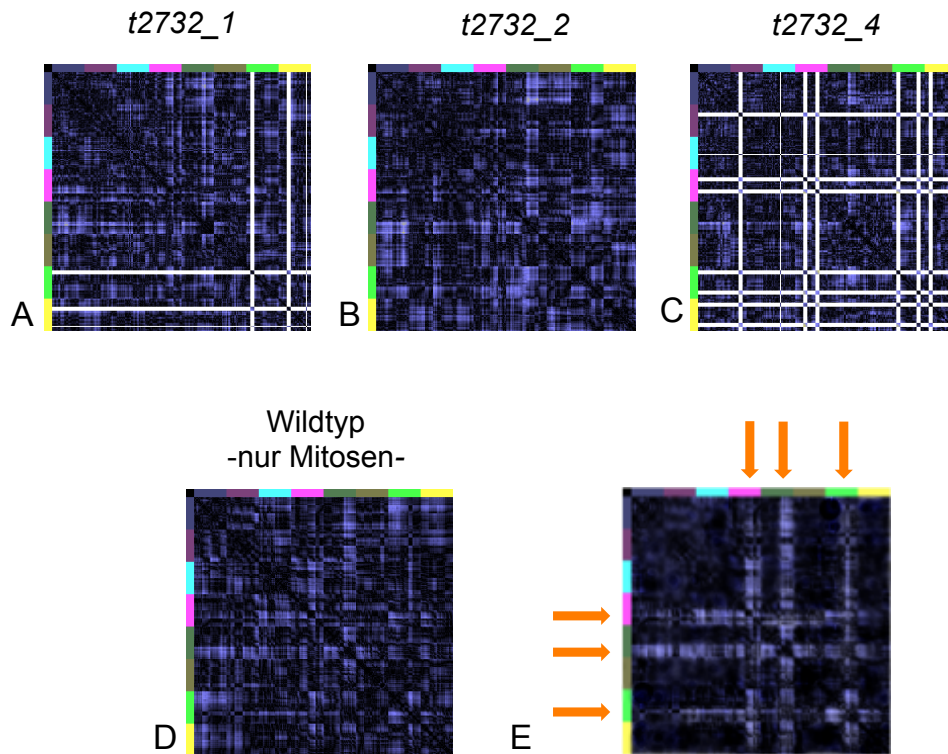
**Abb. 59:** Aus den ermittelten Distanzkarten von *t2732* werden Differenzkarten gebildet. Man erkennt diffuse helle Bereiche. Gemeinsame Muster lassen sich nicht erkennen.

Die Differenzkarten von *t2732* werden mit dem Consensus-Wildtyp verglichen (Abb. 60). Trotz störender Linien durch fehlende Zellen lässt sich ein charakteristisches Muster erkennen! Ein helles Kreuz in ABpla (dunkelgrün) spannt sich durch alle gebildeten Differenzkarten.



**Abb. 60: Die Distanzkarten von *t2732* werden mit dem Wildtyp verglichen.** In den resultierenden Differenzkarten erkennt man ein charakteristisches Kreuz!

Dieses Kreuz ergab sich schon in früheren Berechnungen im Schnabel-Labor. Es ist bioinformatisch möglich die Zellbewegungen durch Migration zu ignorieren und Embryonen zu errechnen, in denen nur die Zellbewegungen durch Mitosen berücksichtigt wurden. Die Ähnlichkeit zwischen der Differenzkarte eines Wildtyps ohne Migrationen und der Differenzkarte von *t2732* zum Wildtyp ist frappierend (Abb. 61)! In der Differenzkarte des Wildtyps ohne Zellmigrationen sind insgesamt drei Kreuze zu erkennen (Abb. 61 D+E). Sie befinden sich in den Regionen ABarp (pink), ABpla (dunkelgrün) und ABpra (hellgrün). Diese Kreuze lassen sich in unterschiedlich starker Ausprägung auch in den Differenzkarten von *t2732* zum Wildtyp erkennen. Hierbei ist aber das Kreuz in ABpla (dunkelgrün) am stärksten ausgeprägt.



**Abb. 61: Die Differenzkarten von *t2732* zum Wildtyp ähneln der Differenzkarte des Wildtyps ohne Migrationen.** (A) Differenzkarte von *t2732\_1* zum Wildtyp (B) Differenzkarte von *t2732\_2* zum Wildtyp (C) Differenzkarte von *t2732\_4* zum Wildtyp (D) Differenzkarte eines Wildtyps ohne Zellmigration. Nur die Mitosen tragen zur Zellbewegung bei. (E) Drei helle Kreuze fallen sowohl in den Differenzkarten von *t2732* als auch in der Differenzkarte des Wildtyps ohne Migrationen auf.

Die Zellen in *t2732* scheinen überwiegend durch die Mitosen platziert zu werden. Es gilt nun zu klären, in wie weit die Zellmigration noch zu der falschen Platzierung der Zellen beiträgt. Hierfür werden nun die durchschnittlichen Zellmigrationen und Beelines betrachtet (siehe Abschnitt „Bioinformatische Analyse von *let-19(t3219)*“ (Tab. 16).

**Tabelle 16: Vergleich von Migration und Beeline in Wildtyp und *t2732* in Prozent der Eilänge.**

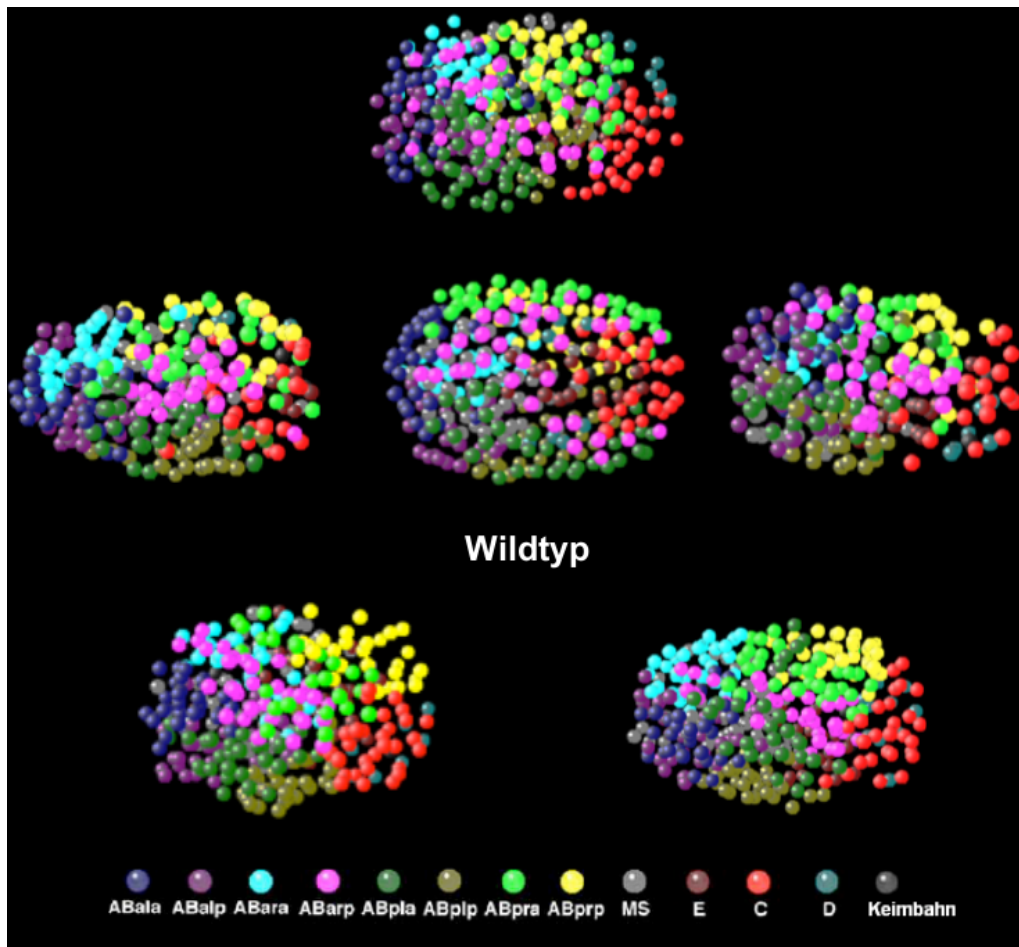
	Wildtyp					<i>t2732</i>				
	1	2	3	4	Ø	1	2	3	4	Ø
Migration	95,0	84,4	87,8	92,2	89,8	109,0	113,5	128,5	97,8	112,2
Beeline	44,0	43,4	45,4	44,0	44,2	46,9	40,6	41,9	34,5	41,0
Quotient	2,2	1,9	1,9	2,1	2,0	2,3	2,8	3,1	2,8	2,8



Die Zellen im Wildtyp wandern im Schnitt zwischen 84,4 und 95,0 Prozent der Eilänge und legen dabei durchschnittlich Beelines 44,0 bis 45,4 Prozent der Eilänge zurück. Daraus ergeben sich Faktoren zwischen 1,9 und 2,2. In *t2732* migrieren die Zellen deutlich stärker als im Wildtyp und legen dabei zwischen 97,8 - 128,5 Prozent der Eilänge zurück. Die Beelines liegen zwischen 34,5 und 46,9 Prozent der Eilänge und somit ergibt sich ein Faktor von 2,3 – 3,1. Bildet man einen Mittelwert der analysierten Embryonen sieht man, dass die Zellmigration stark erhöht ist. Die Zellen in der Mutante legen 112,2 Prozent Eilänge zurück, wohingegen die Zellen im Wildtyp nur 89,8 Prozent der Eilänge zurücklegen. Da die Längen der Beelines in der Mutante fast den Längen der Beelines im Wildtyp entsprechen, ergeben sich unterschiedlich hohe Faktoren. Im Wildtyp liegt der Faktor bei 2,0 und in der Mutante *t2732* bei 2,8. Die Zellen wandern viel stärker, allerdings legen sie eine geringere Distanz zurück. Vergleicht man dies mit den Erkenntnissen der Differenzkarte, erkennt man, dass die Zellen anscheinend ziellos um ihren Ursprungsort taumeln. Dies ist in dieser Mutante noch deutlich stärker der Fall als in *t3219(lef-19)*.

### Visualisierung der Zellpositionen mit 3D-Repräsentationen in *t2732*

Um die Positionen der Zellen weiterführend zu analysieren, werden die 3D-Repräsentationen aus SIMI° Biocell von *t2732* und dem Wildtyp verglichen (Abb. 62). In den fünf analysierten Embryonen von *t2732* liegen grobe Fehler in der Zellpositionierung vor. Keine der Regionen scheint korrekt ausgeprägt worden zu sein. Man erkennt so auch deutlich, dass die Regionen, die im Laufe der Embryogenese elongieren, wie z. B. ABpla (dunkelgrün) oder ABpra (hellgrün) in der Mutante ungeordnet in der Nähe ihres Entstehungsortes liegen. Die charakteristische ypsilonförmige Struktur von ABarp (pink) ist in keiner der Mutanten erkennbar.

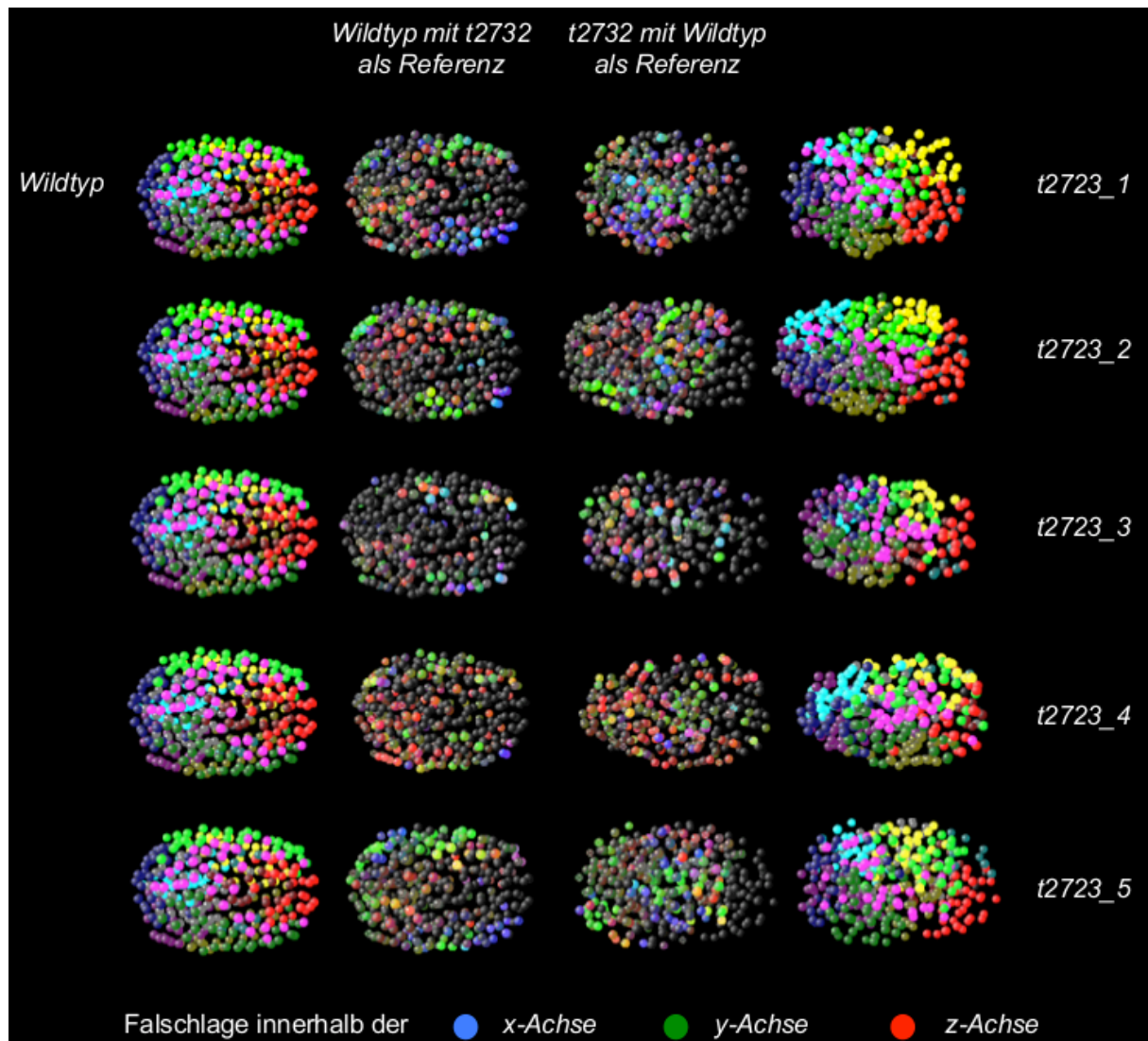


**Abb. 62: 3D-Repräsentationen der Mutante *t2732* im Vergleich zum Wildtyp (Mitte).** Die Zellpositionierung unterscheidet sich extrem vom Wildtyp.

Die fünf analysierten Embryonen werden nun mit dem Wildtyp verglichen. Dazu werden zunächst die Falschlagen der Zellen in den Mutanten mit dem Wildtyp als Referenz berechnet. Bei identischer Zellposition wird die Zelle im Modell schwarz eingefärbt. Weicht die Zellposition ab, wird dies farbig im Modell vermerkt. Abweichungen innerhalb der x-Achse werden in blau dargestellt, innerhalb der y-Achse in grün eingefärbt und innerhalb der z-Achse in rot markiert. Weicht die Zellposition innerhalb mehrerer Achsen ab, entstehen Mischfarben. Um nun erkennen zu können, wo das Pendant einer eingefärbten Zelle im Wildtyp sitzt, wird auch die „Falschlage“ im Wildtyp mit der Mutante als Referenz berechnet. So erhält man zwei Kugelmodelle in denen dieselben Zellen markiert sind und sich so gut vergleichen lassen.

Die Zellen in *t2732* sind in allen Achsen falsch positioniert (Abb. 63). Während im Embryo *t2732\_4* die Zellen vor allem innerhalb der z-Achse falsch liegen, sind sie in den Embryonen *t2732\_1* und *t2732\_5* eher innerhalb der x- und y-Achse falsch

positioniert. Es fällt auf, dass falsch positionierte Zellen im Zentrum des Embryos sitzen. Im Wildtyp befinden sich diese Zellen am Rand des Embryos. Dies entspricht der Beobachtung, dass die Regionen nicht elongieren und die Zellen nah an ihrem Entstehungsort verbleiben. Im Wildtyp befinden sich die Zellen des Darmes im Zentrum des Embryos. In *t2732* wandern die Darmvorläuferzellen zwar ein, werden dann aber im weiteren Verlauf von anderen Zellen verdrängt.



**Abb. 63: Vergleich der 3D-Repräsentationen von *t2732* und des Wildtyps.** Die Embryonen von *t2732* weisen starke Fehlpositionen innerhalb aller Achsen auf.

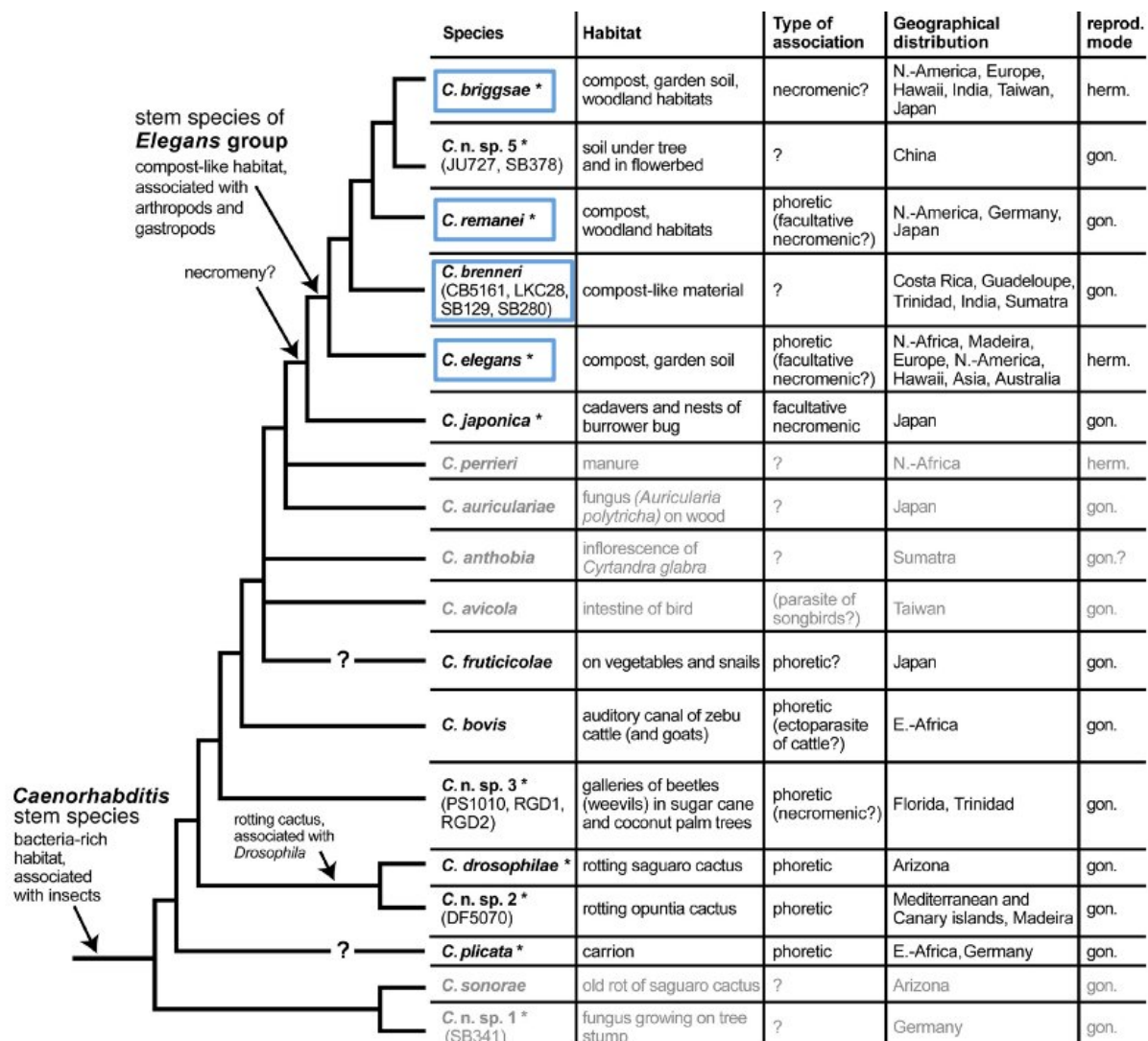
Es lässt sich kein übergeordnetes Muster einer falschen Zellpositionierung erkennen. Die unmarkierten Zellen im posterioren Bereich suggerieren eine korrekte Anordnung. Allerdings täuscht dies, da nur die Zellen der AB-Zelllinie in diesem Rechenmodell bewertet werden. Es ist folglich ein Großteil der Zellen falsch

positioniert. Die Falschlage betrifft hierbei alle Achsen. Eine Elongation bestimmter Regionen findet nicht statt.

In jeder der verschiedenen Analysen bestätigt sich die Vermutung, dass die Zellen in *t2732* zwar stark migrieren, aber dabei kaum Wegstrecke zurücklegen. Sie scheinen ziellos um ihren Entstehungsort zu taumeln. Der Defekt ist so stark ausgeprägt, dass sich keine der Regionen annähernd korrekt ausbildet. Es ist auffallend, dass sich die untersuchten Embryonen alle individuell voneinander unterscheiden. Gemeinsamkeiten in Schicksalsbildung und Migration liegen nicht vor.

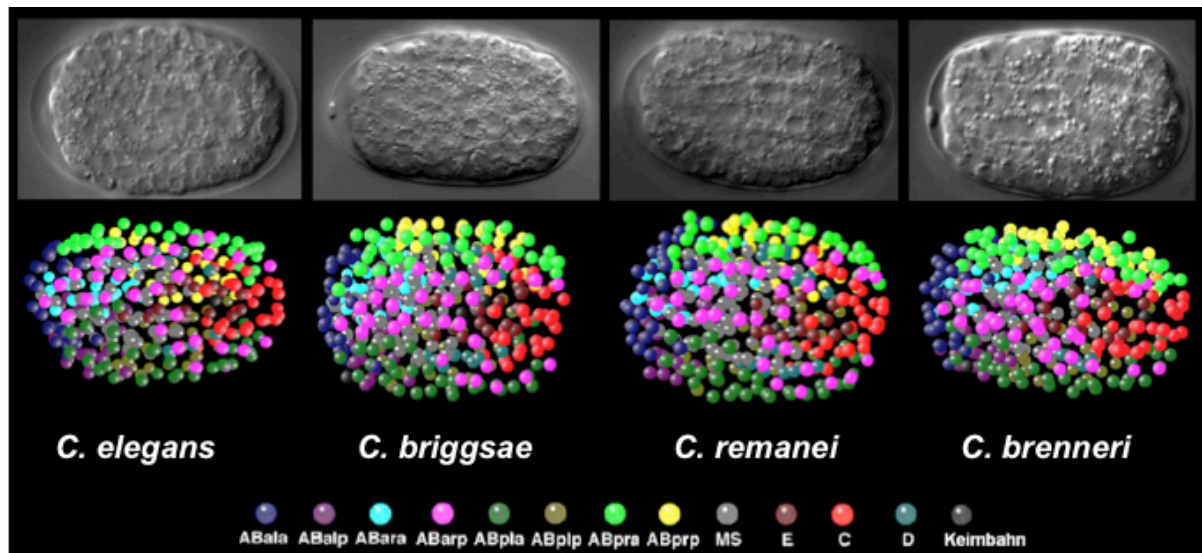
## Exkurs: Sortierung der Zellen in anderen *Caenorhabditis*-Arten

Die vier *Caenorhabditis*-Arten *C. elegans*, *C. briggsae*, *C. remanei* und *C. brenneri* (Abb. 64) unterscheiden sich deutlich auf Ebene des Genoms (Thomas, 2008). Trotzdem ähneln sich diese vier Arten frappierend in Anatomie und Verhalten. Da unsere Arbeitsgruppe vermutet, dass der Prozess der Zellfokussierung essentiell und hochkonserviert ist, soll die Zellmigration in der Embryogenese in diesen vier Arten nun analysiert werden. Dabei wurde *C. briggsae* von Nadin Memar analysiert und *C. remanei* und *C. brenneri* von mir. Als Wildtyp wurde der übliche Referenzembryo verwendet.



**Abb. 64: Phylogenetischer Stammbaum der *Caenorhabditis*-Familie** Die vier betrachteten Arten *C. briggsae*, *C. remanei*, *C. brenneri* und *C. elegans* sind blau markiert. (modifiziert aus Kiontke, K. & Sudhaus, W., 2006)

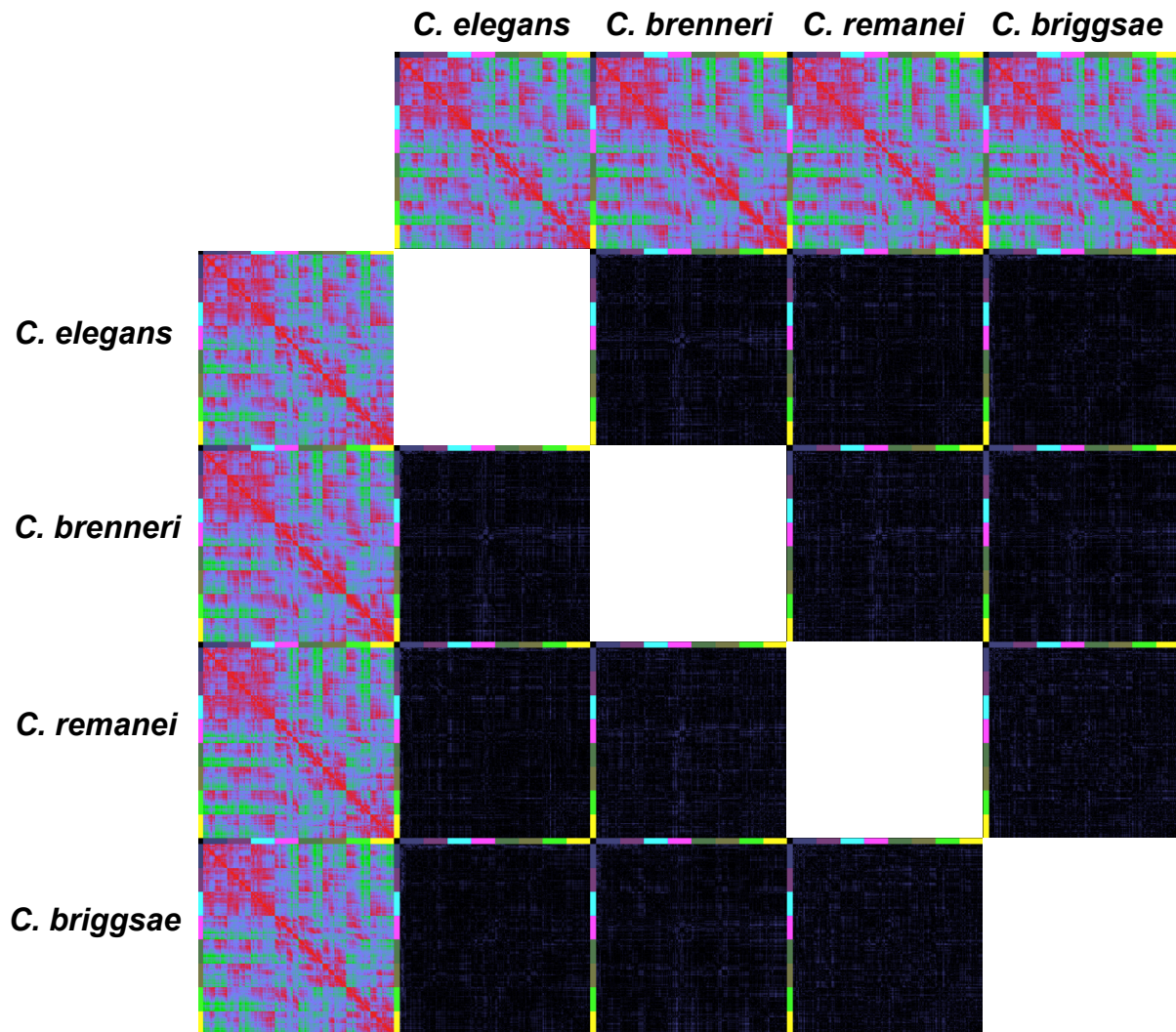
Die Dokumentation der Embryogenese mit SIMI° Biocell zeigt eine bemerkenswerte Ähnlichkeit innerhalb der Arten. Die Zellen verhalten sich wie in *C. elegans*. Als Unterschiede fallen eine Pause nach der fünften Zellteilungsrunde und ein etwas dotterhaltigeres Cytoplasma in *C. brenneri* auf. Sowohl die Normarski-Bilder als auch die 3D-Repräsentationen wirken aber nahezu identisch (Abb. 65). Die Regionen aus den Gründerzellen bilden sich auf dieselbe Weise in allen vier Arten aus!



**Abb. 65: Normarski-Aufnahmen des prämorphogenetischen Stadiums der vier untersuchten *Caenorhabditis*-Arten und die entsprechenden 3D-Repräsentationen.** Die vier Arten ähneln sich bemerkenswert. Unterschiede sind kaum feststellbar.

Um die Positionierung der Zellen in der Embryogenese weiterführend zu betrachten, werden Distanzkarten von den vier Arten erstellt und miteinander verglichen (siehe Abschnitt „Bioinformatische Analyse von *let-19(t3219)*“). Die Distanzkarten ähneln sich stark. In den resultierenden Differenzkarten sind kaum helle und somit unterschiedliche Bereiche erkennbar (Abb. 66). Leichte Abweichungen findet man im Bereich ABarp (pink) in *C. brenneri*. Hier scheinen sich die Zellen geringfügig anders zu positionieren.





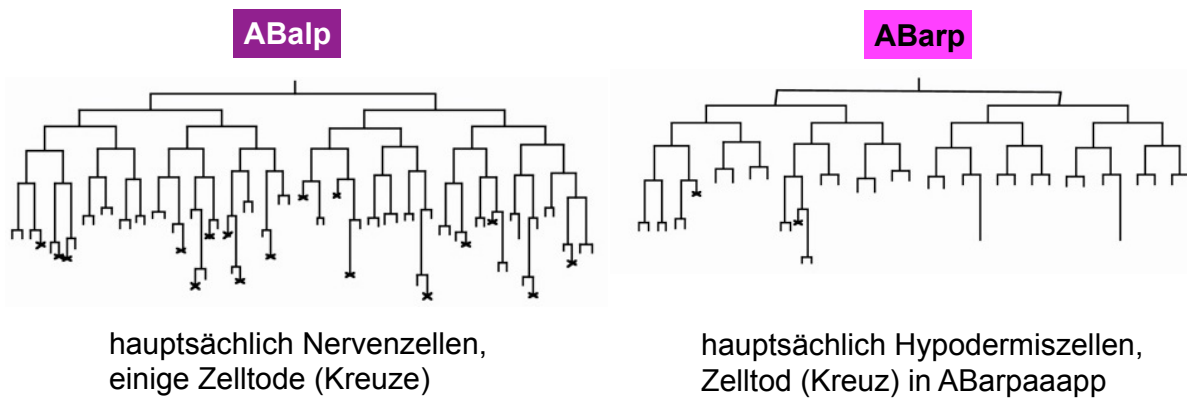
**Abb. 66:** Aus den Distanzkarten der vier untersuchten *Caenorhabditis*-Arten werden **Differenzkarten** gebildet. Die Distanzkarten sind untereinander sehr ähnlich. Die resultierenden Differenzkarten sind dementsprechend sehr dunkel. Nur *C. brenneri* hat anscheinend leichte Abweichungen in der Region ABarp (pink).

In *C. elegans* wird die links-rechts-Asymmetrie durch ein Signal der Zelle MS induziert (Hutter & Schnabel, 1994). Ablatiert man die Mutterzelle EMS mit einem Laser wird dieses Signal nicht mehr ausgeführt. Statt den Zellschicksalen der Regionen ABalp und ABarp bilden sich nun zweimal die Zellschicksale der Region ABarp aus. Die Regionen ABalp und ABarp lassen sich mit Hilfe einer Zelllinienanalyse deutlich voneinander unterscheiden. In ABalp entstehen neben einigen charakteristischen Zelltodten überwiegend Nervenzellen, während in ABarp vor allem Hypodermiszellen und ein Zelltod in ABarpaaappp gebildet werden.

Die Zelle EMS wurde ebenfalls in *C. brenneri*, *C. remanei* und *C. briggsae* ablatiert. In allen Arten lag nun zweimal das ABarp-Schicksal statt des ABalp- und ABarp-

Schicksal vor. Es ließen sich der Zelltod nach der neunten Zellteilungsrunde in ABarp und die Hypodermiszellen detektieren (Abb. 67).

### Zellschicksale in den vier *Caenorhabditis*-Arten



### Zellschicksale in den vier *Caenorhabditis*-Arten nach EMS-Ablation



**Abb. 67: Änderung der Zellschicksale durch EMS-Ablation in den vier *Caenorhabditis*-Arten.** Die links-rechts Asymmetrie wird in *C. elegans* durch eine Induktion der Zelle MS festgelegt. So entstehen verschiedene Regionen mit verschiedenen Zellschicksalen. Fehlt diese Induktion, entsteht statt des ABalp- und ABarp-Schicksals zweimal das ABarp-Schicksal. Dieses Phänomen lässt sich in allen analysierten *Caenorhabditis*-Arten beobachten.

Es scheint, dass die grundlegenden Prinzipien der Zellmigration in der Embryogenese in den vier Arten identisch sind.

Das prämorphogenetische Stadium ist in den vier Arten sehr ähnlich. Die Zellen bilden identisch aussehende Regionen und die Differenzkarten zeigen kaum Unterschiede auf. Die untersuchten Embryonen erlangen durch eine Induktion von MS ihre links-rechts-Asymmetrie. Die Zellen scheinen sich folglich in den hier untersuchten Arten abhängig von ihrem Schicksal anzuordnen und legen dafür Distanzen zurück. Dies spricht dafür, dass der Mechanismus der Zellfokussierung in allen vier Arten greift und somit ein konservierter und essentieller Mechanismus zur Formbildung in der Embryogenese ist.



## Diskussion

Die Ausbildung biologischer Form im Zuge der Embryogenese ist ein faszinierendes Phänomen. Diese Arbeit befasst sich dabei nun mit der Hypothese der Zellfokussierung. Sie besagt, dass Zellen sich über gerichtete Migrationen korrekt anordnen. In mehreren Mutantenlesen wurden in unserer Arbeitsgruppe verschiedene Mutanten isoliert, die offensichtliche Defekte in der Zellfokussierung tragen (Memar, 2012 und Wiekenberg, 2012). So wurden verschiedene Aspekte dieses Mechanismus näher erläutert.

### *let-19(t3219)*, der Mediatorkomplex und die Zellfokussierung

Die Mutante *let-19(t3219)* zeigt den erwarteten Zellfokussierungsphänotyp. Bei restriktiver Temperatur sterben die Embryonen in einem chaotischen Zustand. Dabei konnte durch umfangreiche Zelllinienanalysen und immunhistochemische Untersuchungen eine korrekte Ausprägung der Zellschicksale nachgewiesen werden. Die Migration der Zellen wurde bioinformatisch mit dem Programm Phainothea untersucht. Es zeigte sich, dass die Zellen ungerichtet durch den Embryo wanderten. Dabei ließ sich kein übergeordnetes Muster erkennen - die Zellen wanderten unterschiedlich in jedem analysierten Embryo.

Im Zuge dieser Dissertation wurde die Mutation in der Zellfokussierungsmutante *t3219* als Allel von *let-19* identifiziert. *let-19* ist ein hochkonserviertes Gen, das für eine Untereinheit der CDK-Domäne des Mediatorkomplexes codiert (siehe Abschnitt „*let-19(t3219)* codiert für eine Einheit des Mediatorkomplexes“). Über die CDK-Domäne mit dem Protein LET-19 wird spezifisch die Transkription vieler wichtiger Gene in der Entwicklung geregelt (Wang *et al.*, 2004).

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den Daten von Wang *et al.*, bemerkt man, dass es sich bei *let-19(t3219)* nicht um einen Nullphänotyp handelt. Die Gruppe beobachtete in einem RNAi gegen *let-19* im Wildtyp, dass die Nachkommen im 200-300-Zellstadium arretieren. Die Zellschicksale scheinen sich dabei nicht korrekt auszubilden (Wang *et al.*, 2004). Eine ähnliche Beobachtung machte Anne Wiekenberg mit der isolierten Mutante *let-19(t3205)*: Hier sind die Zellschicksale ebenfalls nicht korrekt ausgeprägt. Weitere Mutanten wie *let-19(os33)*, *let-19(os36)*

und *let-19(mn19)* sind steril (Yoda *et al.*, 2005). Der Phänotyp von *let-19(t3219)* ist deutlich milder: Die Embryonen sterben mit korrekt differenzierten Zellen im chaotischen Zustand. Vermutlich besitzt dieses schwache Allel noch ausreichend Restaktivität um den Defekt abzumildern. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass erste Schicksalsänderungen auftreten, die mit unseren Methoden nicht zu detektieren waren. Hierfür könnten die wenigen fehlenden Zelltode sprechen, die im Zuge der Zelllinienanalyse bemerkt wurden. Da trotzdem ein Großteil der Zellen das korrekte Zellschicksal hat und dabei fehlerhaft migriert, bleibt *let-19(t3219)* nach der angewandten Definition eine Zellfokussierungsmutante. Es liegt hier ein Defekt vor, durch den korrekt differenzierte Zellen falsch wandern.

Die Arbeitsgruppe von Hitoshi Sawa beobachtete ebenfalls fehlende asymmetrische Zellteilungen in Mutanten von *let-19* (Yoda *et al.*, 2005). So wird in *let-19(mn19)* das Protein TLP-1 nach der T-Zellteilung in der L1-Larve nicht mehr asymmetrisch verteilt. Ob solche asymmetrischen Verteilungen essentiell für eine korrekte Zellfokussierung sind, bleibt offen. Weiterführende bioinformatische Analysen könnten klären, welche Schwesterzellen nach einer Teilung im Wildtyp deutlich unterschiedlich migrieren. Diese Zellen ließen sich dann in *let-19(t3219)* beobachten. Sind dann trotz der scheinbar ziellosen Migrationen innerhalb des Embryos Muster zu erkennen – z. B. indem beide Schwesterzellen nun ähnlich migrieren – könnte man möglicherweise ermitteln, wann die Zellfokussierung zeitlich beginnt und ob dies dem beobachteten Ordnungsprozess ab der achten bzw. neunten Teilungsrunde entspricht.

Es ist schwer über einen Transkriptionsfaktor wie LET-19 tiefere Kenntnisse über den Mechanismus der Zellfokussierung zu gewinnen. Ein oder mehrere Gene, die die Zellfokussierung steuern, werden vermutlich über LET-19 im Mediatorkomplex reguliert. Ein weiterführender Ansatz wäre die Bestimmung des Transkriptoms in *let-19* bei permissiver und restriktiver Temperatur. Dabei sollte ein starkes Allel wie *let-19(t3205)* untersucht werden. Zusätzlich lässt sich vorher mit einem RNAi ein Null-Phänotyp in der Mutante bei restriktiver Temperatur provozieren. Die Gene, die nun bei restriktiver Temperatur im Gegensatz zu permissiver Temperatur exprimiert bzw. nicht exprimiert werden, sollten dann mit Techniken wie RNAi weiter untersucht

werden. So lässt sich eventuell ein Zellfokussierungsphänotyp generieren und endlich klären, welche Gene die Zellfokussierung steuern.

## Das Rätsel von *t2732*

Die Mutante *t2732* zeigt bei der restriktiven Temperatur einen faszinierenden Adhäsions-Phänotyp. Das Zellteilungsmuster wird sehr stark asynchron, es bilden sich Hohlräume zwischen den Zellen und die Embryonen sterben in einem höchst chaotischen Zustand. Die Schicksale entsprechen nicht dem Wildtyp. Dies wurde durch intensive Zelllinienanalysen und immunhistochemische Untersuchungen eindeutig gezeigt. Eine korrekte Zelladhäsion ist aber essentiell für die Zell-Zell-Kommunikation und damit auch für die Induktionen verschiedener Zellschicksale. In *t2732* ist der Prozess der Zelladhäsion gestört. Daher überrascht es nicht, dass die Zellen in dieser Mutante nicht ihr korrektes Schicksal erhalten. Die bioinformatischen Analysen mit PhainoThea zeigen einen chaotischen Phänotyp. Die Zellen wandern ziellos durch den Embryo und scheinen um ihren Ursprungsort zu taumeln. Dabei legen sie eine geringe Distanz zurück. Dies wird sehr augenscheinlich durch Differenzkarten illustriert: Die Differenzkarten der analysierten Mutanten von *t2732* ähneln frappierend der Differenzkarte des Consensus-Wildtyps in dem rechnerisch alle Migrationen entfernt wurden und so nur die Bewegungen durch Mitosen dargestellt werden!

Trotz Whole-Genome-Sequencing und sorgfältiger Komplementationsversuche in den entsprechenden Bereichen, ließ sich die temperatursensitive Mutation nicht identifizieren. Dies ist sehr ungewöhnlich und wurde bisher noch nicht in unserer Arbeitsgruppe beobachtet. Durch das Whole-Genome-Sequencing wissen wir, dass eine starke Kopplung an den linken Arm von Chromosom III vorliegt und dort drei Missense-Mutationen auftreten: *Y82E9BR.14*, *M01G5.1* und *let-805*. Diese Mutationen wurden einzeln und in Kombination komplementiert. Dabei ließen sich nie Linien etablieren, keins der untersuchten Gene scheint in *t2732* die temperatursensitive Mutation zu tragen. Auch ein synthetischer Phänotyp ist unwahrscheinlich, da sich solch ein Phänotyp aufheben sollte, wenn bereits eine der entsprechenden Mutationen erfolgreich komplementiert wird.

Das Labor von Oliver Hobert wies uns allerdings darauf hin, dass ebenfalls eine geringe Kopplung an einen Bereich auf Chromosom I (ca. 2,5 MB vom linken Chromosomenende an) vorliegt (Abb. 48) (persönliche Kommunikation, Oliver Hobert). Diese Kopplung ließ sich ausschließlich im Whole-Genome-Sequencing auffinden. Es ist nicht auszuschließen, dass hier in der ursprünglichen Mutante ein Modifier vorlag, der im Laufe der Kreuzungen wegfiel. Für diese Vermutung spricht, dass in der DNA der temperatursensitiven Kandidaten nach dem SNP-Mapping in diesem Bereich keine Region zu finden war, in dem ausschließlich die Wildtyp-Sequenz vorliegt (persönliche Kommunikation, Oliver Hobert). Da folglich überall Rekombination auftrat und die untersuchten Individuen temperatursensitiv waren, kann dies nicht die Position der temperatursensitiven Mutation sein. Trotz allem scheint in diesem Bereich eine Mutation gelegen zu haben, die Einfluss auf *t2732* hatte.

In dem Bereich auf Chromosom III mit der stärksten Kopplung befinden sich insgesamt 34 Mutationen. Neben den drei Mutationen in proteincodierenden Bereichen, die ausführlich untersucht wurden, findet man folglich 31 Mutationen, die sich strangaufwärts, strangabwärts oder in Introns befinden (siehe Anhang). Es gilt als sehr unwahrscheinlich, dass Mutationen in diesen Bereichen einen temperatursensitiven Phänotyp auslösen. Die bisherigen temperatursensitiven Mutanten, die in unserem Labor isoliert wurden, hatten alle Mutationen im proteincodierenden Bereich. Natürlich lässt sich nicht ausschließen, dass auch andere Mutationen einen temperatursensitiven Phänotyp auslösen. Es ist durchaus vorstellbar, dass eine Mutation innerhalb der regulierenden Sequenzen einen temperatursensitiven Effekt hat. Durch fehlerhafte Bindung von Transkriptionsfaktoren bei restriktiver Temperatur könnte durchaus ein deutlicher Phänotyp ausgelöst werden. Es bietet sich folglich an, diese Mutationen, die im Whole-Genome-Sequencing aufgezeigt wurden, weiterführend zu überprüfen. Da neun Mutationen nicht unterhalb einer komplementierenden Duplikation liegen (siehe Abschnitt „Komplementation der Mutation mittels einer Duplikation“), können sie vernachlässigt werden. Somit bleiben noch 22 Kandidaten, die weiterführend analysiert werden können.

Es lässt sich auch nicht ausschließen, dass sich *t2732* nicht durch Transformation komplementieren lässt. In unserer Arbeitsgruppe wurden Mutanten wie *sem-4(t3206)* isoliert, die vermutlich so stark dosisabhängig sind, dass Komplementationsversuche früh scheitern und die Nachkommen nach wenigen Generationen sterben (Wiekenberg, 2012). In solch einem Fall kann man versuchen, den Phänotyp der Mutante mit einem RNAi gegen die Kandidatengene im Wildtyp zu kopieren. Die Methode des RNAi zeigt allerdings nicht bei allen Genen einen Phänotyp, daher sind potentielle negative Ergebnisse nicht vollständig auswertbar.

Letalität durch den Überschuss von Genkopien lässt sich auch mit der homologen Rekombination einer Genkopie vermeiden. Über das *Mos1*-Transposon aus *Drosophila mauritiana* und die *Mos1*-Transposase lassen sich gezielt DNA-Sequenzen in das Genom von *C. elegans* einbringen (Robert & Bessereau, 2010). So könnten die Kandidatengene weiterführend untersucht werden.

Mutationen können auch eine überschießende Genaktivität verursachen. Solche Mutationen lassen sich ebenfalls nicht komplementieren. Da sich *t2732* aber mit der Duplikation *sDp3* komplementieren lässt, kann man diesen Aspekt ausschließen.

*t2732* bleibt eine faszinierende Mutante. Die Identifikation der temperatursensitiven Mutation kann möglicherweise neue Erkenntnisse über Zelladhäsion und Zell-Zell-Kommunikation bringen und wird daher in unserer Arbeitsgruppe weitergeführt.

## Phainothea und die Bioinformatischen Methoden

Die Bioinformatischen Methoden wurden mit dem Programm Phainothea durchgeführt. Es zeigt deutlich und präzise Defekte in der Zellpositionierung der Mutanten auf. So ließ sich für die Mutanten *let-19(t3219)* und *t2732* belegen, dass deren Zellen in der Embryogenese auf restriktiver Temperatur ziellos wandern und dabei nur geringe Distanzen zurücklegen. Dabei wurde auch hervorgehoben, dass dieses Merkmal in *t2732* viel stärker ausgeprägt ist, als in *let-19(t3219)*. Vergleicht man sowohl Differenzkarten, als auch den RMS von beiden Mutanten gegen den Wildtyp, werden die augenscheinlichen Unterschiede solide quantitativ bewertet – der Phänotyp von *t2732* ist deutlich stärker ausgeprägt als in *let-19(t3219)*.

Bemerkenswert ist die Möglichkeit, mittels Distanz- und Differenzkarten Zusammenhänge zu sehen, die sonst kaum erkennbar scheinen. Der Nachweis, dass sich die Zellen in *t2732* kaum von ihrem Entstehungsort entfernen und nur ziellos taumeln, wird sehr deutlich im Vergleich der Differenzkarten von *t2732* mit der Differenzkarte eines Wildtyps, in welchem rechnerisch alle Migrationen entfernt wurden. Die Bioinformatik ist ein großartiges Hilfsmittel um Zellfokussierungsmutanten umfassend zu charakterisieren. Allerdings bringen Mutanten mit asynchronem Zellteilungsmuster die bioinformatischen Methoden an ihre Grenzen. Nur drei der fünf analysierten Embryonen von *t2732* ließen sich vollständig bioinformatisch auswerten. Hier wäre es hilfreich, wenn die Programme so modifiziert werden, dass sich auch Mutanten mit asynchronem Zellteilungsmuster bearbeiten lassen. Es ist nicht auszuschließen, dass in Zellfokussierungsmutanten das Zellteilungsmuster gestört ist, daher sollten unsere bioinformatischen Programme diese Option beinhalten.

Eine weiterführende Möglichkeit zur Analyse von Zellmigrationen wäre außerdem die genauere Untersuchung der Dorsal-Ventral-Achse und der Rechts-Links-Achse. Methoden wie die DDMs beachten sehr stark die Anterior-Posterior-Achse im Embryo. Es ist unbestritten, dass auf dieser „längsten“ Achse des Embryos die stärksten Migrationen möglich sind. Einige Regionen des Embryos (z.B. ABplp, ABprp) umspannen den Embryo auf dieser Achse. Doch es muss auch Migration innerhalb anderer Achsen geben. Dies ließe sich anschaulich in modifizierten DDMs darstellen.

Weiter ist es wichtig, die bioinformatischen Methoden nicht nur auf die Zellen der AB-Zelllinie zu beschränken. Aus den Zellen der MS-, C- und D-Zelllinie entwickeln sich ebenfalls wichtige Gewebe im Embryo. Da es Zellfokussierungsmutanten geben könnte, deren Phänotyp sich in einer falschen Zellmigration einer bestimmten Gruppe von Zellen zeigt, sollte die Migration aller Zellen untersucht werden.

## Die vier Mutantenlesen

Die durchgeführten Mutantenlesen führten zu einer breiten Palette unterschiedlicher temperatursensitiver Mutanten. Das Spektrum der isolierten Phänotypen war umfangreich und vielseitig. Für eine bessere Übersicht haben wir 28 Kategorien entwickelt und mit denen die vorliegenden Phänotypen beschrieben (Tab. 3).

Diese Kategorien beinhalten unter anderem Defekte, durch die auf restriktiver Temperatur keine Embryonen entstehen, wie z. B. Sterilität oder das ausschließliche Ablegen von Oozyten (A1 – A5). Mutanten mit diesen Defekten kamen verhältnismäßig häufig vor. Sie lassen sich mit unseren Methoden nicht weiter analysieren.

Die Kategorie B1 beinhaltet Embryonen mit sichtbaren Veränderungen im Cytoplasma. In einer 4D-Aufnahme erscheint das Cytoplasma als leicht strukturierte Fläche. In einer Reihe von isolierten Mutanten wirkt es allerdings grobkörnig oder zu glatt. Hier vermuten wir Defekte im Fettstoffwechsel. Die Arbeitsgruppe von Frank Döring in Kiel arbeitet an diesen Mutanten unter ernährungsphysiologischen Aspekten.

Es ließen sich weitere Anomalitäten finden, die früh in der Embryonalentwicklung auftraten (C1 - C5). Betroffene Mutanten hatten dann Defekte in frühen Zellteilungen, waren polynukleär oder bildeten keine intakten Spindeln aus. Solche Defekte sind sehr schwerwiegend und die Mutanten starben im Laufe der Entwicklung. Da die frühen Zellteilungen in *C. elegans* ein populäres Forschungsthema sind, ist die Analyse dieser Mutanten von großem Interesse.

Durch eine Zelllinienanalyse von Mutanten lässt sich das Zelltodmuster nach der neunten Zellteilungsrunde dokumentieren und mit dem Wildtyp vergleichen. Liegen hier grobe Abweichungen vor, ist dies ein Hinweis auf einen potentiellen Schicksalsdefekt (G 6). Es ließ sich aber auch beobachten, dass die Zelltode in den Mutanten nicht phagozytiert wurden und die sterbenden Zellen durch den Embryo wanderten oder sich zu viele Zelltode im Embryo ansammelten. Hier kann nun ein Defekt im programmierten Zelltod vorliegen (D 1). Da der Mechanismus der

Apoptose hochkomplex ist und noch viele offene Fragen beinhaltet, ist die Klonierung dieser Mutanten wünschenswert.

Während einer normalen Embryonalentwicklung lassen sich im prämorphogenetischen Stadium im Normarski-Bild deutlich Pharynx- und Darmcluster erkennen. Etwas später treten dann auch Muskelzuckungen auf. In unserer Mutantenlese isolierten wir Stämme, die diese Cluster nicht korrekt ausprägen konnten oder keine Muskelzuckungen mehr hatten (F2 - F5). Diese Mutanten haben meist inkorrekte Zellschicksale.

Fehler in der späten Embryonalentwicklung wurden in die Kategorien G1 - G6 geordnet. So ließen sich Mutanten isolieren, in denen die ventrale Furche nur unvollständig von den Hypodermiszellen umschlossen wurde. In der weiteren Entwicklung platzten diese Embryonen auf und starben in einem chaotischen Zustand. Ein häufiger Phänotyp waren auch deformierte Pretzeln, die verschiedenartige Ausbeulungen im anterioren Bereich hatten. Meist konnten diese Embryonen nicht mehr schlüpfen.

Anhand deutlich sichtbarer Hohlräume zwischen den Zellen ließen sich Mutanten mit Adhäsionsdefekten erkennen. Fehler in diesem grundlegenden Prozess verursachen oft eine Vielzahl weiterer interessanter Defekte – die Mutante *t2732*, die in dieser Dissertation charakterisiert wird, ist ein gutes Beispiel hierfür.

Verschiedene Phänotypen treten oft in Kombination miteinander auf. So sind häufig Mutanten, die einen Defekt in frühen Zellteilungen haben (C1) auch später polynukleär (C2) und Mutanten mit gestörten Zellschicksalen (G6) haben oft auch Defekte innerhalb der Pharynx-, Darm- und Muskelausprägung (F2 – F5). Wir haben bewusst jeden dieser beobachteten Phänotypen notiert und den entsprechenden Mutanten zugeordnet. So ergeben sich 2992 Phänotypen bei 1736 Mutanten. Mit Hilfe einer Datenbank wurden die Phänotypen kategorisiert, so dass es nun möglich ist, einen gezielten Phänotyp zu suchen. Die Datenbank gibt dann eine Beschreibung des Phänotyps, eine 4D-Aufnahme, die Einfriernummer und - wenn vorhanden - eine Zelllinienanalyse aus.

Viele Arbeitsgruppen sind bereits an uns herangetreten, um Mutanten mit spezifischen Phänotypen für ihre Forschung zu erhalten. Da wir diese



Mutanten-Kollektion als wichtigen Beitrag für die Worm-Community sehen, freuen wir uns über dieses Interesse und stellen die jeweiligen Stämme gerne zur Verfügung. Wir warten ebenfalls gespannt auf die Ergebnisse des Million Mutation Project von Professor Don Moerman. Im Zuge dieses Projektes möchte er 2000 mutagenisierte Stämme komplett sequenzieren und bat unsere Gruppe um 200 verschiedene Mutanten aus unseren Mutantenlesen.

Da sich Zellfokussierungsmutanten erst durch eine 4D-mikroskopische Analyse identifizieren lassen, war unser Ansatz zur Mutantenlese sehr zeitintensiv. Jede embryonal letale Mutante musste untersucht werden. Limitierende Faktoren sind folglich eine begrenzte Anzahl an 4D-Mikroskopen und die zeitaufwendige Analyse mit SIMI° Biocell. Auch wenn das Ergebnis der Mutantenlese dadurch sehr vielfältig wurde, muss selbstverständlich reflektiert werden, ob dieser Ansatz nicht verbesserungswürdig ist. Durch die sorgsame Identifizierung und Klassifizierung der verschiedenen Phänotypen brauchten die Mutantenlesen ca. 2,5 Jahre bis zu ihrem Abschluss. Dabei wurden nur drei Zellfokussierungsmutanten gefunden.

Eine schnellere Variante, um auf embryonal letale Mutanten mit einem Zellfokussierungsphänotyp zu selektieren, wäre eine groß angelegte immunhistochemische Analyse. Dazu müsste der Test auf Temperatursensitivität auf NGM-Platten in einem größeren Maßstab durchgeführt werden. Je 40 L4-Larven sollten auf die restriktive Temperatur gebracht werden und dort über 24 h inkubieren. Von Platten, auf denen keine lebenden Nachkommen zu finden sind, würden die Embryonen gesammelt und immunhistochemisch auf die korrekte Ausprägung der Gewebe Pharynx, Darm und Muskeln überprüft werden. Stämme, in denen die Zellzahl der Embryonen dem Wildtyp entspricht und in denen die Zellen chaotisch verteilt sind, wären dann potentielle Kandidaten für Zellfokussierungsmutanten. So könnten innerhalb von 48 h über 100 Mutanten vorselektiert werden!

Das Whole-Genome-Sequencing ist mittlerweile sehr preisgünstig. Es bietet sich an, die interessanten Kandidaten nach der Antikörperfärbung zu sequenzieren. Das dafür benötigte SNP-Mapping ließe sich außerdem mittels des COPAS Biosort deutlich vereinfachen. Dazu würden die benötigten Kreuzungen konventionell angesetzt werden und die Nachkommen in der F2-Generation anschließend mittels

COPAS Biosort vereinzelt werden. Fünf 96-Well-Mikrotiterplatten wären pro Kandidat ausreichend. Der Test auf Temperatursensitivität könnte wie in der Mutantenlese in Replika-Platten durchgeführt werden. Die temperatursensitiven Nachkommen müssten vereinigt werden und ihre DNA würde nach Protokoll isoliert werden. Bis zu 20 SNP-Mappings ließen sich so parallel durchführen. Ergibt dieses Whole-Genome-Sequencing nun interessante Kandidatengene, wie Gene aus dem Zuckerstoffwechsel, HOX-Gene oder Gene mit unbekannter Funktion, kann sich eine weitere Charakterisierung und Klonierung der Mutation anschließen.

### Gibt es überhaupt die perfekte Zellfokussierungsmutante?

Offen bleibt, ob sich mit einer Lese von temperatursensitiven embryonal letalen Mutanten überhaupt die Probleme der Zellfokussierung klären lassen. Insgesamt wurden in unserer Gruppe vier potentielle Zellfokussierungsmutanten isoliert. Davon haben die drei Mutanten, die in den Mutantenlesen NC - NF isoliert wurden - *let-19(t3219)*, *let-19(t3205)* und *sem-4(t3206)* - eine Mutation in einem Transkriptionsfaktor (Wiekenberg, 2012). Da die hier betroffenen Transkriptionsfaktoren generelle Prozesse steuern, lassen sich kaum weiterführende Aussagen über den Mechanismus der Zellfokussierung treffen.

Es scheint ein Schwachpunkt unserer Mutantenlese zu sein, dass die gefundenen Mutationen mit entsprechendem Zellfokussierungsphänotyp ausschließlich für Transkriptionsfaktoren codieren. Es bleibt die berechtigte Frage, ob sich in einer Lese auf temperatursensitive Mutanten überhaupt Zellfokussierungsmutanten mit Mutationen in anderen Genen isolieren lassen.

Nadin Memar bearbeitete in ihrer Dissertation eine Zellfokussierungsmutante, die in einer Mutantenlese von Dr. Arend Hintze isoliert wurde (Hintze, 2007). Diese Mutante trägt eine Mutation in der Phosphomannomutase 2 (Memar, 2012). Es scheint also tatsächlich Zellfokussierungsmutanten zu geben, die ihre temperatursensitive Mutation nicht in einem Transkriptionsfaktor tragen. Diese Mutante legt nahe, dass die Zellfokussierung über einen Zuckercode an der Zelloberfläche vermittelt wird.

Der Zuckerstoffwechsel ist ein sehr grundlegender Teil innerhalb der Embryonalentwicklung. Mögliche Fehler könnten folglich sehr schwere Auswirkungen haben. Es ist nicht auszuschließen, dass ein Großteil der Zellfokussierungsmutanten schon sehr früh in der Entwicklung stirbt oder die Elterntiere nicht mehr in der Lage sind befruchtete Eier zu bilden. In unserer Ansatz wird der Phänotyp solcher Mutanten nun beispielsweise als „steril“, „ausschließliche Ablage von Oozyten“ oder „Defekte in den ersten Zellteilungen“ klassifiziert und deshalb von unserer Gruppe nicht weiterführend untersucht. Eine Abhilfe wäre hier ein Temperaturwechsel zu späteren Zeitpunkten in der Entwicklung. So könnte man einen potentiellen Zellfokussierungsdefekt sichtbar machen. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass ansonsten ausschließlich Mutationen in Transkriptionsfaktoren gefunden wurden. Da diese die Zellfokussierung vermutlich im späteren Verlauf steuern, lässt sich hier der erwartete Zellfokussierungsphänotyp finden.

Es bietet sich an, eine weitere Lese mit den hier beschriebenen Kriterien durchzuführen. Sollte es weitere Zellfokussierungsmutanten geben, lassen sie sich eventuell so isolieren. Mit ihnen wäre es möglich, den Mechanismus der Zellfokussierung weiter zu erforschen und so zu klären wie biologische Form entsteht. Sollte dieser Ansatz nicht von Erfolg beschieden sein, sind eventuell andere Methoden vorteilhafter. Der Zuckerstoffwechsel in Verbindung mit der Phosphomannomutase 2 ließe sich im Hinblick auf Zellfokussierung weiterführend untersuchen.

### Hat sich die Mutantenlese gelohnt?

Heute basieren die meisten der genetischen und molekularen Analysen weitgehend auf dem Aspekt der Homologie zwischen den verschiedenen Systemen. In der populären Rückwärtsgenetik werden gezielt Gene ausgeschaltet, deren Mutation in anderen Organismen in gut beschriebenen interessanten Phänotypen resultiert. Der klassische genetische Ansatz - die sogenannte Vorwärtsgenetik - ist dagegen vollkommen ergebnisoffen. So ist es möglich über interessante Phänotypen neue Moleküle mit unvermuteten Funktionen zu identifizieren! Deshalb sind viele *C. elegans*-Labore immer noch an neuen Mutanten mit spezifischen Phänotypen interessiert. Im Zuge unserer Mutantenlesen haben wir auch Mutanten sorgfältig analysiert, die keine Zellfokussierungskandidaten waren. So ist eine breite Palette

potentieller Phänotypen entstanden, die wir gerne der Worm-Community zu Verfügung stellen.

Noch vor wenigen Jahren war die Hemmschwelle unbekannte Mutanten zu analysieren sehr hoch, da die Klonierung unbekannter Gene durch SNP-Mapping und Komplementationen sehr mühsam und zeitaufwendig war. Das Whole-Genome-Sequencing hat aber nun diese Sparte revolutioniert: Die Klonierung eines Genes ist kostengünstig in verblüffend kurzer Zeit möglich. Dies steigert natürlich erheblich die Bereitschaft vieler Arbeitsgruppen neue Stämmen zu analysieren. Viele Gruppen arbeiten momentan mit unseren Mutanten und wir sind sehr gespannt, ob neue Funktionen in relevanten Prozessen identifiziert werden. Unsere Arbeitsgruppe ist sich einig, dass die Mutantenlese zwar ein aufwendiges und mühsames Projekt war – sich aber in jedem Fall gelohnt hat!

## Material und Methoden

### Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Zelltod
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> K <sub>3</sub> O <sub>7</sub> • H <sub>2</sub> O	tri-Kaliumcitrat-1-Hydrat
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> • H <sub>2</sub> O	Zitronensäure-Monohydrat
CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	Kupfersulfatpentahydrat
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dTTP	Desoxyribose-thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Eilänge
EMS	Ethylmethansulfonat
F1 – F3	erste bis dritte Filialgeneration
FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	Eisensulfat-Heptahydrat
g	Gramm
GFP	<b>green fluorescent protein</b> : grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GTF	generelle Transkriptionsfaktoren der Polymerase II
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
His	Histidin
Ile	Isoleucin
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Kaliumhydrogenphosphat

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
L1 - L4	Verschiedene Larvenstadien von <i>C. elegans</i>
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	molar
MB	Megabasen
min	Minuten
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Mangandichlorid-Tetrahydrat
mg	Milligramm
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat
NB	erste Mutantenlese
NC	zweite Mutantenlese
ND	dritte Mutantenlese
NE	vierte Mutantenlese
NF	fünfte Mutantenlese
NGM	Nematode Growth Medium
P	Parentalgeneration
PCIA	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Synthetic Dropout Medium
Ser	Serin

SNP	<b>s</b> ingle <b>n</b> ucleotide <b>p</b> olymorphism: Einzelnukleotid-Polymorphismen
TAE	Tris-Essigssäure-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBST	Tris-Buffered Saline Tween 20
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Val	Valin
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	Zinksulfat-Heptahydrat

## Lösungen und Medien

### 10 x Aminosäure-Mix (- Uracil)

- 200 mg Adenin
  - 200 mg Arginin
  - 200 mg Histidin
  - 200 mg Methionin
  - 300 mg Isoleucin
  - 300 mg Tyrosin
  - 1000 mg Leucin
  - 1500 mg Valin
  - 2000 mg Threonin
- auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen und autoklavieren

### Hypochlorit-Lösung

- 6 ml Hypochloritlösung (12%)
  - 2,5 ml 5M KOH
- mit 50 ml dH<sub>2</sub>O auffüllen und lichtgeschützt lagern

### Kaliumcitrat pH 6,0

- 20 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$
  - 293 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- auf 1 l mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auffüllen und autoklavieren

### LB-Medium

- 10 g Tryptone
  - 10 g Yeast Extract
  - 5 g NaCl
- den pH auf 7,5 einstellen, mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen und autoklavieren

### M9-Medium

- 3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 5 g NaCl
  - 1 ml  $\text{MgSO}_4$
- mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen und autoklavieren

### NGM-Medium

- 6 g NaCl
  - 10 g fettes Pepton
  - 29 g Agar
  - 2 ml Cholesterin-Lösung (1 mg auf 200 ml EtOH)
- auf 2 l auffüllen und autoklavieren. Folgendes hinzufügen:
- 10 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$
  - 10 ml 0,1 M  $\text{MgSO}_4$
  - 50 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0
  - 10 ml Nystatinlösung (1 % Stammlösung)
  - 10 ml 20% Sucrose



## PVP-Lösung

10 mg Polyvinylpyrrolidon (PVP) in 500 µl dH<sub>2</sub>O lösen und anschließend mit abs. Ethanol auf 100 ml auffüllen.

## PCIA

25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol

## S-Basal

- 5,85 g NaCl
  - 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- mit dH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und autoklavieren. Anschließend Cholesterol-Lösung (5 mg/ml in Ethanol) hinzufügen

## SD-Medium (- Uracil)

- 6,7 g Yeast Nitrogen Base (w/o Amino Acids)
  - 20 g Glucose
  - 900 ml dH<sub>2</sub>O
  - 100 ml 10 x Aminosäure-Mix (- Uracil)
- pH auf 6,0 einstellen, mit dH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und autoklavieren

## S-Medium

- 1 l S-Basal
  - 10 ml Kaliumcitrat pH 6,0
  - 10 ml Spurenelemente-Lösung
  - 3 ml 1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung
  - 3 ml 1M MgSO<sub>4</sub>-Lösung
- nicht autoklavieren

## Single-Worm-Lysis-Puffer

- 50 mM KCl
- 10 mM TrisCl pH 8,3

- 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 0,45 % (v/v) Triton X100
- 0,45 % (v/v) Tween 20

### Spurenelemente-Lösung

- 1,86 g  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$
  - 690 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
  - 200 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
  - 290 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
  - 25 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen und autoklavieren. Dunkel lagern.

### 50 x TAE-Puffer

- 242 g Tris
  - 57,1 ml Eisessig
  - 100 ml 0,5 M EDTA
- auf 1 l mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auffüllen und autoklavieren

### TBA-Mounting-Puffer

- 7 ml 1,2-Propandiol
  - 2 g TBA (2,3-t-Butyl-4-Hydroxyanisol)
  - 0,6 g n-Propylgallat
  - 400  $\mu\text{l}$  0,1 M Natriumazid
- auf 10 ml mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auffüllen, bei 4 °C lagern

### 5 x TBE-Puffer

- 54g Tris
  - 27,5 g Borsäure
  - 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- auf 1 l mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auffüllen und autoklavieren

#### 4 x TBST

- 0,25 M Tris
  - 0,75 M NaCl
- mit HCl den pH auf 7,4 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen. 2,5 ml Tween 20 hinzufügen

#### TE

- 1 ml 1M Tris-HCl pH 8,0
  - 200 µl EDTA pH 8,0
- auf 100 ml mit dH<sub>2</sub>O auffüllen und autoklavieren

#### 2 x YPAD

- 12 g Yeast Extract
  - 24 g Peptone
  - 24 g Glucose
  - 120 mg Adenin Hemisulfat
- 600 ml dH<sub>2</sub>O hinzufügen und 15 min bei 121°C autoklavieren

### Verwendete Stämme

#### *C. elegans*-Stämme

##### **N2 Bristol**

Der Wildtyp-Stamm von *C. elegans* wird weltweit als Referenzstamm verwendet.

##### ***let-19(t3219)***

Die temperatursensitive Mutante wurde innerhalb der Mutantenlese NE isoliert. Es liegt ein Zellfokussierungsdefekt vor.

##### ***t2732***

Die temperatursensitive Mutante wurde von Arend Hintze isoliert (Hintze, 2007) und hier neu charakterisiert. Es liegt ein Adhäsionsdefekt vor.

### **CB4856**

Der *C. elegans*-Stamm aus Hawaii weist eine Reihe von unterschiedlichen Polymorphismen auf. Er eignet sich gut für eine SNP-Kartierung von Mutationen.

### **SP582**

Dieser Stamm trägt eine kurze Defizienz, die *let-19* umfasst.

Genotyp: *unc-4(e120) mnDf46/mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444)* II

### **BC4172**

Dieser Stamm trägt eine freie Duplikation, die den linken Arm von Chromosom III abdeckt.

Genotyp: *let-707(s2462) dpy-17(e164) unc-32(e189)* III; sDp3 (III;f)

### **RW3625**

Der Stamm trägt eine balancierte Mutation in *let-805*. Er wurde von Michelle Hresko hergestellt und lässt sich über das CGC erwerben.

Genotyp: *let-805(st456)/qC1 dpy-19(e1259) glp-1(q339)* III

### **RB1184**

Dieser Stamm trägt eine Deletion im Gen *Y82E9BR.14*. Er wurde vom *C. elegans* Gene Knockout Project bereitgestellt und ist über das GCG erwerbbar.

Genotyp: *Y82E9BR.14(ok1230)* II

### **JK1122**

Genotyp: *dpy-17(e164) unc-32(e189)/qC1 dpy-19(e1259) glp-1(q229)* III

### **SP17**

Genotyp: *dpy-1(e1) unc-32(e189)*

### **GE6299**

Die temperatursensitive Mutante wurde innerhalb der Mutantenlese NE isoliert. Es liegt eine Vielzahl an Defekten vor.

**GE5417**

Die temperatursensitive Mutante wurde innerhalb der Mutantenlese NE isoliert. Es liegt ein Schicksalsdefekt vor.

**GE5425**

Die temperatursensitive Mutante wurde innerhalb der Mutantenlese NE isoliert. Es liegt ein synthetischer Defekt vor.

**Bakterienstämme****DH5α**

Ein *Escherichia coli*-Stamm, der für molekulargenetische Experimente genutzt wird.

Genotyp: *F endA1 supE44 thi-1 λ<sup>-</sup> recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U196, hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)* (Hanahan, 1983)

**HT115**

Ein *Escherichia coli*-Stamm, der für RNAi-Feeding-Experimente genutzt wird.

Genotyp: *F mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, λ<sup>-</sup>, rnc14::TN10(DE3 lysogen:lacUV5 promotor – T7 polymerase)* (Karnath et al., 2000)

**OP50**

Ein Uracil-auxotropher *Escherichia coli*-Sicherheitsstamm, der *C. elegans* in Kultur als Nahrung dient.

**Haltung und Manipulation von *C. elegans*****Kultivierung von *C. elegans***

Wie in der Literatur beschrieben (Brenner, 1974; Wood, 1988), erfolgt die Kultivierung von *C. elegans* auf NGM-Medium mit dem *E.coli*-Stamm OP50 als Futter. Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, erfolgt die Haltung bei 15°C.

## Mutagenese

10 Platten mit überwiegend L4-Larven des Wildtyps werden mit M9-Puffer abgespült und die Würmer werden in einem 15ml-Reaktionsgefäß gesammelt. 3 ml der Wurmsuspension werden in ein kleines Reagenzglas überführt. In der Zwischenzeit wird 1 ml M9-Puffer mit 20 µl EMS gemischt. Die Wurmsuspension wird mit der EMS-Lösung versetzt und stark aufgewirbelt. Es folgt eine vierstündige Inkubation bei RT in denen die Würmer alle 10 min stark aufgewirbelt werden. Das Wurmpellet wird dann auf 1ml dH<sub>2</sub>O geschichtet und sinkt langsam ab. Es folgen vier Waschschrte mit M9-Puffer. Anschließend werden die Würmer auf große NGM-Platten pipettiert und können sich dort für 2-3 Stunden bei permissiver Temperatur regenerieren. Je 20 L4-Larven werden auf neue große NGM-Platten gegeben und bei der permissiven Temperatur inkubiert, bis die F2-Generation angewachsen ist. Diese wird dann mittels COPAS Biosort vereinzelt.

## Vereinzeln von Würmern mit dem COPAS Biosort von Union Biometrica

Der COPAS Biosort ist ein Gerät um kleine Partikel zu sortieren und eignet sich hervorragend um verschiedene *C. elegans*-Stadien zu trennen.

Es werden je drei bis vier gut bewachsene große NGM-Platten mit autoklaviertem Leitungswasser abgespült. Die Würmer sedimentieren, so dass der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden kann. Nach einem Waschschrte mit 30 ml Leitungswasser wird das sedimentierte Pellet in 50 ml Leitungswasser aufgenommen und in den Samplecup überführt. Dort wird die Suspension mittels eines Rührkerns aufgewirbelt und unter Druck in eine Küvette geleitet. Der optimale Sample-Druck liegt hier bei 4,8. In dieser Küvette misst ein Laser die Größe der Objekte innerhalb der Suspension. Mit Hilfe eines zusätzlichen Wasserstahls, des sogenannten Sheath, wird eine mittige Anordnung der Objekte innerhalb der Küvette gewährleistet. Der optimale Sheath-Druck liegt bei 3,8. Über die Software des COPAS Biosort lässt sich die gewünschte Objektgröße bestimmen. In diesem Versuchsablauf wurde nach adulten Würmern gesucht. Detektiert der Laser nun einen Wurm in korrekter Größe, wird der Wurm in eine 96-Well-Platte mit 150 µl S-Medium und OP50 als Nahrungsquelle vereinzelt. Die Platte fährt dann automatisch eine Position weiter, so dass nun das nächste Well befüllt werden kann. Wenn Sample- und Sheath-Druck optimal eingestellt sind, lässt sich eine Durchflussrate

von 9 ml Suspension pro Minute erreichen und durchschnittlich 90 der 96 Wells einer Mikrotiterplatte werden korrekt befüllt.

## Isolierung der temperatursensitiven Mutanten

Mit Hilfe des Biomek FXp der Firma Beckman Coulter ließen sich die Mikrotiterplatten automatisch replizieren um Kopien für den Test auf Temperatursensitivität zu erhalten.

Nach Bestückung der Platten mit adulten Würmern durch den COPAS Biosort inkubieren die Platten sechs bis acht Tage bei permissiver Temperatur um die nächste Generation anwachsen zu lassen. In neue Mikrotiterplatten wird nun je 100 µl S-Medium mit OP50 pro Well vorgelegt. In diese Platten werden nun mit Hilfe des Biomek FXp 40 µl aus jedem Well der Originalplatten transferiert. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, werden die Pipettenspitzen im Roboter mit Hypochloritlösung gespült. Die so erhaltenen Replikaplaten inkubieren sechs bis acht Tage bei restriktiver Temperatur. Dann erfolgt eine manuelle Prüfung, ob die Würmer lebende Nachkommen haben. Befinden sich nur adulte Würmer ohne Larven in einem Well, gilt die Mutante als Kandidat für Temperatursensitivität. Die entsprechenden Würmer aus den Originalplatten werden gesammelt und in neue Mikrotiterplatten mit S-Medium gegeben. Nach einer Woche Inkubation bei permissiver Temperatur werden erneut Replikaplaten mit der Biomek FXp hergestellt und bei der restriktiven Temperatur auf Temperatursensitivität getestet. Ist eine Mutante auch bei diesem zweiten Test temperatursensitiv, wird sie aus den Mikrotiterplatten bei permissiver Temperatur auf eine kleine NGM-Platte pipettiert. Wenn die Mutante angewachsen ist, werden fünf L4-Larven bei restriktiver Temperatur inkubiert. Sind nach 48 h keine Nachkommen auf der Platte, gilt der Stamm als Temperatursensitiv und wird näher charakterisiert und eingefroren.

## Auskreuzen

Der genetische Hintergrund einer Mutante lässt sich durch mehrmaliges Auskreuzen reinigen. Dazu werden von der zu untersuchenden Mutante vier L4-Larven mit 12 Wildtyp-Männchen zusammengesetzt. Die befruchteten Hermaphroditen werden anschließend vereinzelt. War die Kreuzung erfolgreich, werden 10 L4-Larven der F1-Generation erneut vereinzelt. Die folgende F2-Generation wird auf die zu

untersuchende Mutation hin überprüft. Nun kann mit den homozygoten Hermaphroditen der ausgekreuzte Stamm angeimpft werden.

### Test auf Temperatursensitivität

Um zu überprüfen, ob ein Stamm eine temperatursensitive Mutation trägt, werden fünf L4-Larven auf die restriktive Temperatur (25°C) gebracht. Legen sie ausschließlich tote Eier handelt es sich um eine temperatursensitive Mutation.

### DNA-Isolation aus *C. elegans* mittels Single-Worm-Lysis

Eine schnelle und kostengünstige Methode um DNA aus *C. elegans* zu isolieren, ist die Single-Worm-Lysis. Es werden 100 µl M9-Puffer auf eine verhungerte Platte gegeben, 50 µl werden davon wieder abgenommen und mit 50 µl 2 x Single-Worm-Lysis-Puffer vermennt. Nach Zugabe von 6 µl Proteinase K wird die Lösung 1 h bei 60°C inkubiert und dabei mehrfach aufgewirbelt. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgt durch Erhitzen auf 94°C für 10 min.

### DNA-Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine Aufreinigung isolierter DNA erfolgt oft über die Phenol-Chloroform-Extraktion. Zu der Probe wird ein Volumenteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gegeben. Die Phasen werden vermischt und es wird für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumenteilen Ethanol (96 %) vermischt. Es werden weitere 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet ist, kann es in TE oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen werden.

### Synchronisieren

Adulte Würmer mit Eiern werden mit M9-Puffer von den Platten abgespült und sinken in einem 15ml-Reaktionsgefäß ab. Der Überstand wird entfernt, die Würmer werden mit 5 ml Hypochloritlösung versetzt und dann für 2 min stark geschüttelt. Anschließend werden sie abzentrifugiert (4800 rpm, 2 min) und der Überstand wird



entfernt. Es wird anschließend mit M9-Puffer gewaschen um dann erneut 5 ml Hypochloritlösung hinzugegeben. Dabei wird jetzt so lange kräftig geschüttelt, bis die Wurmhüllen nicht mehr vorhanden sind. Die Würmer werden dreimal mit M9-Puffer gewaschen. Über Nacht werden die Eier bei 15°C geschüttelt, so dass L1-Larven schlüpfen können. Auf Grund des Nährstoffmangels können die sich nicht weiterentwickeln. Wenn man nun die L1-Larven auf NGM-Platten gibt, entwickeln sie sich synchron weiter.

### Aufreinigen von kontaminierten *C. elegans*-Stämmen

Wenn ein Stamm von *C. elegans* mit Pilzen oder Bakterien kontaminiert ist, wird sein Wachstum oft negativ beeinträchtigt. Er lässt sich aufreinigen, indem man adulte Hermaphroditen mit vielen Eiern in einen Tropfen Hypochloritlösung gibt, dort aufschneidet und mit einem weiteren Tropfen M9-Puffer auf eine neue Platte transferiert. Die Kontamination wird so abgetötet und aus den Eiern schlüpfen gesunde Larven.

### Komplementationstest

Der Komplementationstest dient der raschen Identifizierung von temperatursensitiven Mutationen. Eine Stamm, mit einer bereits bekannten Mutation, wird mit dem zu untersuchenden Stamm gekreuzt. Sind beide Mutationen im selben Gen, besitzen die Nachkommen in der F1-Generation bei der restriktiven Temperatur kein funktionsfähiges Genprodukt mehr und sind daher nicht lebensfähig. Liegen die Mutationen aber in verschiedenen Genen ist die Komplementation erfolgreich. In der F1 entstehen lebensfähige heterozygote Nachkommen.

### Test auf maternale oder zygotische Vererbung

Die Transkripte maternaler Gene müssen dem Embryo von der Mutter zur Verfügung gestellt werden, während die embryonale Expression zygotischer Gene für eine erfolgreiche Entwicklung ausreicht. Kreuzt man eine zu untersuchende Mutante mit Wildtyp-Männchen, lässt sich feststellen ob ein maternaler oder zygotischer Erbgang vorliegt. Die heterozygoten Würmer der F1-Generation werden auf die restriktive Temperatur gebracht. Haben sie lebende Nachkommen, liegt eine maternale

Versorgung vor. In einem zygotischen Erbgang werden 75% der Nachkommen schlüpfen und 25% in der Embryogenese sterben.

## Ermitteln der temperatursensitiven Phase

Für eine umfassende Charakterisierung eines Genes in *C. elegans* ist auch der Zeitpunkt, an dem das Genprodukt benötigt wird, festzustellen. Da im Zuge dieser Arbeit temperatursensitiven Allele untersucht wurden, bietet sich ein Temperatursprungexperiment an. Bei der permissiven Temperatur (15°C) bildet sich bei temperatursensitiven Mutanten ein funktionsfähiges Genprodukt und die Mutanten verhalten sich ähnlich dem Wildtyp. Ist die Mutante aber zum Zeitpunkt, an dem das Genprodukt benötigt wird, bei der restriktiven Temperatur (25°C), ist es defekt und die Mutante kann sich nicht korrekt entwickeln. Um nun die gesuchte Zeitspanne einzugrenzen, werden Embryonen verschiedener Stadien sowohl von der restriktiven Temperatur auf die permissive Temperatur gebracht (Downshift), als auch von der permissiven auf die restriktive Temperatur (Upshift). Nach 24 h lässt sich der Prozentsatz der toten Embryonen auswerten. Die Zeitspanne in der 50 % der Embryonen im Downshift sterben, bis zu dem Zeitpunkt, an dem 50% der Embryonen im Upshift überleben und als gesunde L1-Larven schlüpfen, gibt den Wirkungszeitpunkt des zu untersuchenden Genes an.

## 4D-Mikroskopie

Um die Embryonalentwicklung eines Embryos zu verfolgen, bietet sich die 4D-Mikroskopie an (Schnabel *et al.*, 1997). Hierzu werden adulte Hermaphroditen in ein wassergefülltes Blockglas gegeben und aufgeschnitten. Frühe Eier werden auf ein Agarpad (4,5%) auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe einer Wimper mittig angeordnet. Ein Deckglas wird vorsichtig auf das Präparat gelegt. Nachdem das Präparat mit Wasser gefüllt wurde, werden die Ränder des Deckglases sorgfältig mit flüssiger Vaseline verschlossen.

Ein motorisiertes Zeiss Axiovert Mikroskop mit Nomarski-Optik (Schnabel *et al.* 1997) nimmt nun alle 35 s Bilder von 25 Ebenen innerhalb des Embryos auf. Die Längen der Aufnahmen variieren je nach *C. elegans*-Stamm zwischen 750 und 1000 Scans. Bei Bedarf lassen sich auch mit Hilfe einer LED-Lampe verschiedene fluoreszierende Marker wie GFP und mCherry in einzelnen Scans detektieren. Im Anschluss wird ein

terminaler Phänotyp aufgenommen, der aus drei Scans besteht. Die so gewonnenen Daten lassen sich nun mit dem Programm SIMI° Biocell bioinformatisch auswerten.

### Immunofluoreszenzfärbung mit der Methanol Aceton Methode

Teflonbeschichtete Multi-Well-Slides werden vorgewärmt und mit 0,25 mg/ml Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet. *C. elegans*-Embryonen werden vorsichtig auf den Objektträger pipettiert und überschüssiges Wasser wird abgeschüttelt. Ein 24x60 mm Deckglas mit 1,5 mm Dicke wird behutsam linksbündig aufgesetzt. Auf einem Metallblock in flüssigem Stickstoff wird der Objektträger für 10 min gekühlt. Durch Abschlagen des aufgelegten Deckglases wird die Eihülle der Embryonen aufgebrochen. Das Präparat inkubiert dann erst 10 min in eiskaltem Methanol, dann 10 min in eiskaltem Aceton und wird dann an der Luft getrocknet. Es kann nun bei -20°C eingefroren werden. Vor der Färbung äquilibriert der Slide 15 min in 1 x TBST. Anschließend wird das Präparat mit 5 µl primärem Antikörper pro Well über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die Slides werden in 1 x TBST gewaschen und mit 5 µl des sekundären Antikörpers pro Well für 4 h bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschen in 1xTBST wird das Präparat mit 4 µl TBA-Mounting-Puffer pro Well behandelt. Dieser Puffer schützt das Präparat wirkungsvoll vor dem Ausbleichen. Abschließend wird das Präparat mit einem passenden Deckglas versiegelt.

### Transformation mit biolistischem Bombardement

Transformationen von *C. elegans* lassen sich effektiv mit der Methode des biolistischen Bombardements durchführen (Wilm *et al.*, 1999).

Es werden zunächst Schießplatten vorbereitet. Dazu pipettiert man 15 µl OP50 auf kleine NGM-Platten und lässt die Bakterien über Nacht bei RT trocknen. Vor Beginn des Transformationsexperimentes werden die Platten auf Eis gekühlt.

In ein 1,5 ml – Reaktionsgefäß werden 1 mg Goldpartikel eingewogen. Es werden 100 µl 50 mM Spermidinlösung hinzugegeben und für 5-10 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Danach folgen 10 min Inkubation bei RT in denen das Gemisch regelmäßig manuell aufgewirbelt wird. Es werden nun 16 µl DNA hinzugegeben und erneut 10 min bei RT inkubiert. Bei Co-Transformationen wird die DNA davor im Verhältnis 1:1 gemischt. Das DNA-Goldgemisch wird mit dH<sub>2</sub>O auf

360 µl aufgefüllt und inkubiert erneut für 10 min bei RT. Anschließend werden 100 µl 1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung tropfenweise zugegeben, es wird kurz kräftig geschüttelt und 10 min präzipitiert. Das Gemisch wird 15 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und dreimal mit Ethanol (96 %) gewaschen. Anschließend werden 200 µl PVP-Lösung hinzugegeben.

In der Zwischenzeit werden die Würmer zum Schießen vorbereitet. Dazu werden 6-8 Platten mit jungen Adulten mit M9-Puffer abgespült. In einem Röhrchen sedimentieren die Würmer, so dass sich der Überstand absaugen lässt. Je 20 µl der Wurmlösung werden auf den OP50-Tropfen der Schießplatten gegeben. Um Scherkräfte zu minimieren, werden die Würmer hierbei mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze pipettiert.

Ein gereinigter Filterhalter der Kanone wird aufgeschraubt und es werden 20 µl des DNA-Goldgemisches hinein pipettiert. Der Filterhalter wird in der Kanone fixiert und eine der vorbereiteten Wurmplatten wird darunter gestellt. Ein Plexiglaszylinder macht es möglich, dass mittels einer Vakuumpumpe ein Unterdruck von -0,4 bar aufgebaut wird. Zu diesem Zeitpunkt muss die Kanone manuell ausgelöst werden. Die Schießplatte wird nun je nach Wachstumsverhalten des Stammes gesechelt oder geachtet. Die Teile werden auf große NGM-Platten transferiert. Je nach Transformationsexperiment kann nach wenigen Tagen auf Temperatursensitivität, Fluoreszenz oder sichtbare Marker selektiert werden.

## Isolierung von DNA aus *C. elegans* mit dem Gentra Puragene Kit von Qiagen

3 – 4 unkontaminierte Platten voller Würmer werden mit M9-Puffer in ein 15 ml-Reaktionsgefäß abgespült. Die Platten dürfen nicht länger als einen Tag verhungert sein. Die Würmer werden abzentrifugiert und das Pellet wird dreimal mit M9 gewaschen. Damit die Würmer das im Darm verbliebenen Futter verdauen, lässt man sie für 2 h bei 20°C sanft schütteln. Es wird erneut zweimal mit M9-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird der Überstand abgenommen, so dass ein Pellet von ca. 500 µl Würmern bleibt. Das Pellet wird für mindestens 1 h bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen werden 3 ml Cell Lysis Solution und 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugegeben und für 3 h bei 55°C

inkubiert. Dabei wird das Gemisch regelmäßig invertiert. Wenn die vollständige Lyse der Würmer eingetreten ist, lässt man das Lysat auf RT abkühlen. Es werden nun 15 µl RNase A Solution hinzugegeben und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Lösung wird dann für 3 min auf Eis gekühlt und dann mit 1 ml Protein Precipitation Solution versetzt. Nach kräftigem Durchmischen wird 10 min bei 2000 xg zentrifugiert. Zu dem Überstand wird Isopropanol gegeben und es wird 50mal invertiert. Nach erneuten 3 min Zentrifugation bei 2000 xg wird der Überstand entfernt. Das Pellet wird mit 3 ml Ethanol (70%) gewaschen, an der Luft getrocknet und in 150 µl DNA Hydration Solution aufgenommen. Die Konzentration für das Whole-Genome-Sequencing muss über 500 ng/µl liegen.

## SNP-Mapping

Im Zuge eines SNP-Mappings wird die zu untersuchende temperatursensitive Mutante mit dem Stamm *CB4856* aus Hawaii gekreuzt (Wicks *et al.*, 2001). Dieser Stamm unterscheidet sich in einzelnen Basenpaaren (jedes 1400ste bp, Jakubowski, 1999) vom Wildtyp. So können in der DNA neue Restriktionsschnittstellen entstehen oder vorhandene Restriktionsschnittstellen wegfallen. DNA. 350 Nachkommen in der F2-Generation werden nun auf Temperatursensitivität getestet. Je 50 Platten von temperatursensitiven bzw. temperaturneutralen Nachkommen werden vereinigt und die DNA wird isoliert. Nun kann durch den Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen untersucht werden, wie eng SNP und temperatursensitive Mutation gekoppelt sind. Ist die Kopplung sehr stark, wird zwischen Mutation und SNP kaum Rekombination stattfinden und es lässt sich nach Analyse im Agarosegel überwiegend das Wildtyp-Bandenmuster nachweisen. Je schwächer die Kopplung ist, umso gleichmäßiger treten Wildtyp- und *CB4856*-Bandenmuster auf.

## Whole-Genome-Sequencing

Die isolierte DNA aus dem SNP-Mapping wurde im Labor von Oliver Hobert mit Hilfe des Whole-Genome-Sequencing analysiert. Die Durchführung erfolgte dort wie beschrieben in Bigelow *et al.* (2009), Doitsidou *et al.* (2010) und Sarin *et al.* (2010).

## Lokalisierung von Mutationen im Genom mittels Dreifaktorkreuzung

Eine klassische Art des Genkartierens ist eine Dreifaktorkreuzung (Fay, 2006). Hierbei werden Rekombinationsereignisse mittels Neuverteilung von sichtbaren Markern detektiert. Man wählt zwei sichtbare Marker, wie z.B. die *dpy*- oder *unc*-Phänotypen, die sich als Einzelmutation und als Doppelmutation gut bestimmen lassen. Kreuzt man die temperatursensitive Mutation nun mit der Doppelmutante, lassen sich in der F2-Generation neben den Phänotypen der Eltern auch die entkoppelten Marker finden. Diese werden vereinzelt und auf Temperatursensitivität getestet. Je näher die temperatursensitive Mutation an einem Markergen sitzt, umso weniger Rekombination tritt auf. Aus den sich ergebenden Verhältnissen lassen sich so Rückschlüsse zur Position der temperatursensitiven Mutation erstellen.

## Bioinformatische Methoden

### Analyse der Embryogenese mit SIMI° Biocell

Die Aufnahmen, die im Zuge der 4D-Mikroskopie entstehen, lassen sich mit SIMI° Biocell analysieren. In einem Videofenster lässt sich die Aufnahme aufrufen und mit den Pfeiltasten in der Ebene und der Zeit steuern. Die einzelnen Zellen können verfolgt werden, in dem man in regelmäßigen Abständen mit der Maus einen Punkt in das Zentrum der Zelle setzt. Die Software speichert die manuell eingegebenen Koordinaten und kann so eine 3D-Repräsentation des analysierten Embryos erstellen. Die Nachkommen der 12 Gründerzellen werden alle hierbei spezifisch eingefärbt. So lässt sich die Zellpositionierung im Embryo deutlich darstellen und später mit anderen 3D-Repräsentationen vergleichen. Durch das Verfolgen aller Zellen entsteht nach und nach die komplette Zelllinie des analysierten Embryos. Bestimmte Schicksale, wie Zelltod, Darm oder Hypodermis lassen sich in der Normarski-Aufnahme gut erkennen und in der Zelllinie vermerken. Es ist so möglich, erste Aussagen über die Zellschicksale im untersuchten Embryo zu treffen.

## Vorbereiten der Datensätze für bioinformatische Berechnungen

Bioinformatische Berechnungen werden mit dem Programm Phainothea durchgeführt. Die ursprüngliche Version des Programmes wurde von Arend Hintze im Zuge seiner Dissertation entwickelt (Hintze, 2007) und später von Christian Hennig und Ralf Schnabel umfassend neu aufgesetzt und damit weiterführend modifiziert und verbessert. Der Sourcecode und die Versionen des Programms liegen im Schnabel-Labor vor. Das Programm kann die Datensätze, die mit SIMI° Biocell generiert wurden, auslesen und weiter verarbeiten.

Da die Embryonen in der Analyse mit SIMI° Biocell je nach Aufnahme unterschiedlich liegen, müssen sie zunächst identisch ausgerichtet werden. Um Embryonen verschiedener Größe miteinander zu vergleichen, werden die Distanzen in Eilänge (EL) angegeben.

Die Position der Zellen ist in Form von Koordinaten gespeichert. Dabei werden die Koordinaten der Abszisse und Ordinate in Pixeln und die Koordinaten der Z-Achse in Ebenen angegeben. Eine Ebene entspricht ungefähr 10 Pixeln. Man erhält folglich durch Multiplikation der Koordinaten der Z-Achse mit dem Faktor 10 die entsprechenden Werte in Pixeln.

Die Distanz von einer Zelle A zu einer Zelle B errechnet sich wie folgt:

$$\overline{AB} = \sqrt{(A_x - B_x)^2 + (A_y - B_y)^2 + (A_z - B_z)^2}$$

$A_x$  = Position von Zelle A auf X-Achse  
 $A_y$  = Position von Zelle A auf Y-Achse  
 $A_z$  = Position von Zelle A auf Z-Achse

Um aussagekräftige und gut belegte Modelle einzelner Mutanten zu haben, werden die Daten von fünf Zelllinienanalysen vereinigt und ein sogenannter Consensus-Embryo erstellt.

## Berechnung der Unterschiede zwischen zwei Embryonen

Die Berechnung des „root-mean-square“-Wertes (Cohen & Sternberg, 1980) dient normalerweise dazu, den mittleren Unterschied zwischen gepaarten Zahlenreihen zu

ermitteln. In dieser Arbeit wird dieser RMS-Wert genutzt um die mittlere Abweichung aller Zell-Zell-Distanzen zwischen zwei Embryonen zu ermitteln.

$$RMS_{ref, ver} = \sqrt{\frac{\sum_{a=1}^a \sum_{b=a}^b \left( Dist_{ref}(Zelle_a, Zelle_b) - Dist_{ver}(Zelle_a, Zelle_b) \right)^2}{n}}$$

## Visualisierung der Zellposition mit Distanzkarten

Unter einer Distanzkarte versteht man eine Matrix mit der Dimensionierung Zellzahl mal Zellzahl. Dabei sind die einzelnen Regionen horizontal und vertikal von der anteriorsten bis zur posteriorsten Position aufgeführt. Es werden die Distanzen zwischen den Zellen berechnet. Den Ergebnissen werden anhand eines RGB-Farbkeils entsprechende Farben zugeordnet. Kurze Distanzen erscheinen rot, mittleren Distanzen wird ein blauer Farbton zugeordnet und weite Distanzen werden grün dargestellt. Es lassen sich die kompletten Distanzen betrachten oder nur die Distanzen innerhalb der x-Achse.

## Vergleich von zwei Embryonen mit Differenzkarten

Unterschiede zwischen Distanzkarten von verschiedenen Embryonen lassen sich in Differenzkarten aufzeigen. Dazu werden die RGB-Farbwerte der jeweiligen Positionen voneinander abgezogen und der so neu resultierende Farbwert wird in die Differenzkarte eingefügt. Sind zwei Farbwerte identisch, ergibt sich als Differenz für alle drei Farbteile null und wird folglich im RGB-Code schwarz dargestellt. Je größer die Differenz umso heller wird die resultierende Farbe. So ergibt sich ein Werkzeug mit dem man schnell abweichende Zellpositionen aufzeigen kann.

## Visualisieren der anterior-posterior-Migration mit DDMs

Die Bewegungen der Zellen innerhalb der Embryogenese werden mit DDMs (Direct Distance Map) aufgezeigt. Von der 4. – 9. Zellteilungsrunde wird die Positionierung der Zellen betrachtet. Dazu wird die anteriorste Zelle festgelegt und ihre Entfernung zu allen weiteren Zellen bestimmt. Dies erfolgt bei einem Referenzembryo und dem zu untersuchenden Embryo. Innerhalb der DDM werden die Zellen horizontal von der



anteriorsten bis zur posteriorsten Position aufgeführt. Liegt eine Zelle zu weit anterior, wird sie grün markiert. Ein blauer Farbton zeigt eine zu posteriore Position auf.

## Molekularbiologische Methoden

### Isolierung von chromosomaler DNA von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Transformation von temperatursensitiven Mutanten werden YACs mit Sequenzen des *C. elegans*-Genoms genutzt. Diese YACs werden in *S. cerevisiae* angezüchtet und dann mittels Qiagen Genomic tip 100/G isoliert. Die Vorkultur des Hefe-Stamms wird in 10 ml SD-Medium (-Ura) über Nacht schüttelnd angezogen. Die Hauptkultur soll mindestens 24 h schüttelnd bei 28 °C in 2 x YPAD wachsen. Mit Hilfe einer Thoma-Kammer wird die Zellzahl ermittelt und  $7 \times 10^9$  Zellen werden 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml TE suspendiert, in ein Corex-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert um Reste des Mediums zu entfernen. Durch kräftiges Schütteln wird das Pellet in 4 ml Y1 mit  $\beta$ -Mercaptoethanol suspendiert. Um die Zellwände der Hefe aufzuschließen, werden 250  $\mu$ l Lyticase-Stammlösung (1000 U/ml in dH<sub>2</sub>O) hinzugegeben und bei 30°C für 60-150 min inkubiert. Die Protoplastenbildung muss hierbei mikroskopisch überprüft werden. Die Protoplasten werden 10 min bei 4°C mit 3000 rpm abzentrifugiert. Dem Puffer G2 wird RNase (200  $\mu$ g/ml) hinzugesetzt und die Pellets werden in 5 ml suspendiert. Es werden 100  $\mu$ l Proteinase K zugefügt und 60 – 120 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Die Zelltrümmer werden bei 4°C und 5000 rpm für 10 min abzentrifugiert. In der Zwischenzeit werden die Säulen „Qiagen Genomic tip100/G“ mit 4 ml des Puffers QBT äquilibriert. Der Überstand wird nun auf die Säulen gegeben und es wird dreimal mit 5 ml Puffer QC gewaschen. Der Elutionspuffer QF wird auf 50 °C vorgewärmt und die genomische DNA wird mit 5 ml Puffer von der Säule eluiert. Man gibt 3,5 ml Isopropanol hinzu und mischt sorgfältig. Anschließend wird bei 4°C und 8000 rpm für 20 min zentrifugiert. Die DNA wird mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und erneut bei 4°C und 8000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet wird an der Luft trocknen gelassen. Anschließend wird es in 100 – 200  $\mu$ l TE pH 8,0 suspendiert und soll sich über Nacht vollständig lösen. Am nächsten Morgen wird die DNA in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und kann nun verwendet werden.

## Isolierung von Fosmid-DNA mittels Qiagen tip100

Die Vorkultur wird in 5 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (100 µl/ml) bei 37°C für 6 h angezogen. Die Hauptkultur wächst anschließend über Nacht in 200 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (100 µl/ml). Um die Fosmidsynthese zu induzieren, werden 2 ml 10%-Arabinose-Lösung hinzugegeben. Die Zellen werden dann bei 6000 rpm für 5 min abzentrifugiert, das Pellet wird in 4ml Puffer P1 aufgenommen und in ein PP-Röhrchen transferiert. Die alkalische Lyse erfolgt mit der Zugabe von 4 ml Puffer P2. Es wird vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml kaltem Puffer P3 wird erneut vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden 30 min bei 16000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und erneut bei 4°C und 16000 rpm für 15 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird eine Säule „Qiagen tip100“ mit 4 ml des Puffers QBT äquilibriert. Der Überstand wird auf die Säule gegeben. Anschließend wird zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wird mit 5 ml Puffer QF eluiert und mit 3,5 ml Isopropanol gefällt. Nach vorsichtigem Durchmischen wird bei 10000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 5 ml Ethanol (70%) gewaschen, erneut für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und anschließend an der Luft trocknen gelassen. Es folgt die Aufnahme des Pellets in 100 – 200 µl TE pH 8,0.

## Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten mittels PCR

Definierte DNA-Abschnitte lassen sich mittels der Methode der PCR – *polymerase chain reaction* – amplifizieren. In verschiedenen Zyklen wird die DNA erst denaturiert, dann lagern sich Oligonukleotide, die sogenannten Primer an, von denen die Neusynthese des zweiten Stranges ausgeht. So wird der DNA-Abschnitt gezielt vervielfältigt. Als Polymerase wird die TaKaRa Ex Taq von Takara Bio Inc. verwendet. Ein Beispielsatz ist hier aufgeführt:

## Beispielansatz:

- 38 µl dH<sub>2</sub>O
- 5 µl 10x ExTaq Puffer
- 4 µl dNTPs (2,5 mM each)
- 1 µl Primer forward (25 pmol/µl)
- 1 µl Primer reverse (25 pmol/µl)
- x µl Template-DNA (< 500 ng)
- 0,25 µl TaKaRa Ex Taq (5 U/µl)

## Beispielprogramm:

	94°C	0,5 – 2 min	initiale Denaturierung	
30 x	{	94°C	10 – 30 s	Denaturierung
		x°C	10 – 30 s	Annealing
		72°C	1 min/kb	Elongation
		72°C	5 - 10 min	finale Elongation
		4°C	∞	

Dabei variieren Parameter, wie die Annealingtemperatur und die Menge des eingesetzten Templates. Zur Kontrolle wird das PCR-Produkt neben einem geeigneten Größenstandart in einem 1%-Agarosegel analysiert.

Eine Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgt mit dem Nucleo Spin Extract II von Macherey-Nagel nach Protokoll.

## Restriktionsverdau

DNA kann mit Restriktionsenzymen definiert geschnitten werden.

## Beispielansatz:

- x µl DNA (~250 ng)
  - 0,5 µl Enzym (10 U/µl)
  - 1 µl 10 x Puffer (passend zum Enzym gewählt, siehe Herstellerangaben)
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl auffüllen

Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 3 h oder über Nacht. Die Spaltung wird mit einem 1%-Agarosegel überprüft.

## Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Analytische Gele mit 1 % Agarose in TBE-Puffer wurden genutzt um Restriktionsverdaue oder PCR-Experimente zu überprüfen. Ethidiumbromid wurde hierbei hinzugesetzt um die Fragmentgröße später unter UV-Licht analysieren zu können. Die angelegte Spannung betrug 60 – 80 V.

Gele für die Restriktionsspaltung im Zuge des SNP-Mappings wurden mit 2% Metaphor-Agarose erstellt. Sie liefen bei 150 V und es wurden 15 µl Ethidiumbromid hinzugegeben.

Als Größenstandart wurden je nach erwarteter Fragmentgröße der GeneRuler 1kb, der Lamda DNA/*Hind*III oder der Gene Ruler 100 bp von Fermentas verwendet.

## Literatur

- Baugh, L.R., Hill, A. A. Slonim, D.K., Brown, E.L. and Hunter, C.P.** (2003). Composition and dynamics of the *Caenorhabditis elegans* early embryonic transcriptome. *Development* **130**, 889-900
- Bigelow, H., Doitsidou, M., Sarin, S. and Hobert, O.** (2009). MAQGene: software to facilitate *C. elegans* mutant genome sequence analysis. *Nat Methods* **6**, 549
- Bischoff, M. and Schnabel, R.** (2006). Global cell sorting is mediated by local cell-cell interactions in the *C. elegans* embryo. *Dev Biol* **294**, 432-44
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Brown, R. E. and Mattjus, R.** (2007) Glycolipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 746-60
- Casamassimi, A. and Napoli, C.** (2007). Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: An overview. *Biochimie* **89**, 1439-46
- Cohen, F. and Sternberg, M.** (1980) On the prediction of protein structure: The significance of the root-mean-square deviation *JMB* **138**, 321-3
- Denver, D. R., Dolan, P. C., Wilhelm, L. J., Sung, W., Lucas-Lledó J. I., Howe, D. K., Lewis, S.C., Okamoto, K., Thomas, W. K., Lynch, M. and Baer, C. F.** (2009) A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base- substitution mutation processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 16310-4.
- Doitsidou M., Poole, R., Sarin, S., Bigelow, H. and Oliver, H.** (2010). *C. elegans* mutant identification with a one-step whole-genome-sequencing and SNP mapping strategy. *PLoS One* **5**, e15435
- von Elsner, S.** (2008) Die Entwicklung der Keimbahn während der Embryogenese von *Caenorhabditis elegans*, *Dissertation*
- Fay, D.** (2006) Genetic mapping and manipulation: chapter 3 -Three-point mapping with genetic markers. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- George, S., Simokat, K., Hardin, J., Chisholm, A.** (1998). The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*. *Cell* **92**, 633-43
- Gönczy, P. and Rose, L.** (2005) Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook* ed. The *C. elegans* Research Community
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**, 557-80.
- Hintze, A.** (2007). Charakterisierung der Musterbildung durch Zellwanderungen in *Caenorhabditis elegans*. *Dissertation*

- Hresko, M. C., Schriefer, L.A., Shrimakar, P. and Waterston, R. H.** (1999). Myotactin, a novel hypodermal protein involved in muscle-cell adhesion in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* **146**, 659-72
- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1994). *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* **120**, 2051-64
- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1995). Specification of anterior-posterior differences within the AB lineage in the *C. elegans* embryo: a polarising induction. *Development* **121**, 1559-68
- Hutter, H. and Schnabel, R.** (1995). Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. *Development* **121**, 3417-24
- Jakubowski, J., Kornfeld, K.,** (1999). A local high-density polymorphism map used to clone *Caenorhabditis elegans cdf-1*. *Genetics* **153**, 743-52.
- Kamath, R., Martinez-Campos, M., Zipperlein, P., Fraser, A and Ahringer, J.** (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 2: research0002.1–0002.10
- Kelly, W. G., Xu, S., Montgomery, M. K. and Fire, A.** (1997). Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* **146**, 227-38.
- Kiontke, K. and Sudhaus, W.,** (2006) Ecology of *Caenorhabditis* species, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community,
- Letz, A** (2009) Kartierung und Charakterisierung einer Zelladhäsionsmutante in *C. elegans*. *Bachelor-Arbeit*
- Martin, K.** (2008). Zellmigration in *Caenorhabditis elegans*. *Diplomarbeit*
- Memar, N.** (2012). Form: Zellfokussierung in *Caenorhabditis elegans*. *Dissertation*
- Merris, M., Wadsworth, W. G., Khamrai, U., Bittman, R., Chitwood, D. J. and Lenard, J.** (2003). Sterol effects and sites of sterol accumulation in *Caenorhabditis elegans*: developmental requirement for 4alpha-methyl sterols. *J Lipid Res.* **44**, 172-81
- Nietzsche, F.** (1883). Also sprach Zarathustra. *Verlag von Ernst Schmeitzner*
- Robert, V. J., Bessereau, J.L.** (2010). Manipulating the *Caenorhabditis elegans* genome using mariner transposons. *Genetica* **138**, 541-9
- Rosenbluth, R., Cuddeford, C. and Baillie, D.** (1985). Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. II. A spectrum of mutational events induced with 1500 r of gamma-radiation. *Genetics* **109**, 493-11
- Sarin, S., Bertrand, V., Bigelow, H., Boyanov, A., Doitsidou, M., Poole, R., Narula, S. and Hobert, O.** (2010). Analysis of multiple ethyl methanesulfonate-mutagenized *Caenorhabditis elegans* strains by whole-genome sequencing. *Genetics* **185**, 417-30

- Schnabel, R., Bischoff, M., Hintze, A., Schulz, A., Hejnov, A., Meinhardt, H. and Hutter, H.** (2006). Global cell sorting in the *C. elegans* embryo defines a new mechanism for pattern formation. *Dev Biol* **294**, 418-31
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D. and Schnabel, H.** (1997). Assessing Normal Embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D Microscope: Variability of Development and Regional Specification. *Dev Biol* **184**, 234-65
- Schnabel, R. and Schnabel, H.** (1990). Early determination in the *C. elegans* embryo: a gene, *cib-1*, required to specify a set of stem-cell-like blastomeres. *Development* **108**, 107-19
- Schiemann, S.** (2009). Etablierung eines Phänoms für *Caenorhabditis elegans*, *Diplomarbeit*
- Sigurdson, D. C., Spanier, G. J. and Herman, R. K.** (1984) *Caenorhabditis elegans* deficiency mapping. *Genetics* **108**, 331-45
- Stinchcomb, D. T., Shaw, J. E., Carr, S. H. and Hirsh, D.** (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* **5**, 3484-96.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.
- Thomas, J. H.** (2008). Genome evolution in *Caenorhabditis*. *Brief Funct Genomic Proteomic* **7**, 211-6
- Wang, J., Walker, A., Blackwell, T., Yamamoto, K.** (2004). The *Caenorhabditis elegans* ortholog of *TRAP240*, *CeTRAP240/let-19*, selectively modulates gene expression and is essential for embryogenesis. *J Biol Chem* **279**, 29270-7
- Wicks, S.R., Yeh, R.T., Gish, W.R., Waterstone, R. H. and Plasterk R. H.** (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat. Genet.* **28**, 160-164
- Wiekenberg, A.**, (2012). Zellfokussierung in *C. elegans*: Mutagenese und Mutantenlese zur Isolierung neuer Kandidaten-Gene. *Dissertation*
- Wilm, T., Demel, P., Koop, H. U., Schnabel, H. and Schnabel, R.** (1999). Ballistic transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **229**, 31-5.
- Wood, W. B.** (1988). The Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Yoda, A., Kouike, H., Okano, H. and Sawa, H.** (2005). Components of the transcriptional Mediator complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Development* **132**, 1885-93
- Zenk, J.** (2012) Klonierung und Analyse des Gens *M01G5.1* von *Caenorhabditis elegans*. *Bachelor-Arbeit*
- Ziegler, S.** (2012) Klonierung und Analyse eines Gens, das für ein Glykolipid Transfer Protein aus *Caenorhabditis elegans* codiert. *Bachelor-Arbeit*

## Anhang

### Primer für das SNP-Mapping von *let-19(t3219)*

CE530	AAGAGGTGTTCTTCTGCAGC
CE531	ACCATCCACGCAGTTCATTC
CE1219	TCCACACTATTTCCCTCGTG
CE1220	GAGCAATCAAGAACCGGATC
CE2116	TTCCCATTTTCCTCCTCCCAG
CE1222	TCAAAAACCCAGACACTGG

### Primer für das SNP-Mapping von *t2732*

CE202	CCATCGATTTTGTCTGCTGG
CS203	AACAATGGCTCCGTGATG
CE2597	CTGCTTATAGTCTTCCTGTCTG
CE2598	GCAACCCACCTTCAATGAC
CE2599	GTTGAGCTCGTGAGACCTTTC
CE2600	ATGTGGTATGGATCAGTGGTGG
CE2601	AAACCACCTGAAACTGGAGC
CE2602	AGGAACAAGGTTCTGTGGAGTG
CE2603	CTTCATTGCGCTCACTTCTG
CE2604	TACGCACATGCCTACAAAG
CE2145	GTCGGCCGTTTTCAAATAACTG
CE2146	AGCAAGAATGAGCCGATT
CE3076	CAGACATTTAGGAGTAGGCAGG
CE3077	GAGTACGCGGGTCATTTTTG
CE3078	GTAAATTTTCGGGCTCCCATG
CE3079	AAAAGTGAGCTCATGCTCCG
CE3080	AGCAGATGAAAGTTCCGAGC
CE3081	CCCCGCTGTGGTTATTATAC
CE3082	ATCCGACGAGTCAAATGTGG
CE3083	CTTTTGTTTCAGACGCTTCGC
CE3084	AAGTCGATGAGCTGAACAGTG
CE3085	GTGGTATTTTGAATCTAGGGC



Ergebnisse des Whole-Genome-Sequencings: Mutationen in *t2732* auf dem linken Arm von Chromosom III

**Tabelle 17: Daten des Whole-Genome-Sequencings auf Chromosom III (linker Arm) von *t2732***

Start	Reference Base	Sample Base	Class	Description	Gene
154227	C	T	nongenic	-1009 upstream	T17A3.9
154227	C	T	nongenic	246 downstream	T17A3.10
513510	T	G	nongenic	-1336 upstream	F30H5.3
513510	T	G	nongenic	246 downstream	T22F7.5
513512	A	T	nongenic	-1338 upstream	F30H5.3
513512	A	T	nongenic	244 downstream	T22F7.5
805896	G	T	nongenic	-5924 upstream	B0412.2
805896	G	T	nongenic	3459 into	B0412.3.2
805896	G	T	nongenic	3538 into	B0412.3.1
1006069	G	A	nongenic	-4452 upstream	Y34F4.2a
1006069	G	A	nongenic	165 into	R06B10.3
1414051	G	A	missense	CCG->CTG[Pro->Leu]	Y82E9BR.14a.1,Y82E9BR.14a.2
1506296	G	A	missense	GGA->GAA[Gly->Glu]	M01G5.1
1765127	A	T	nongenic	301 downstream	Y46E12A.1
1765127	A	T	nongenic	319 downstream	Y46E12A.4
1773382	C	T	nongenic	-3301 upstream	Y46E12A.4
1773382	C	T	nongenic	-4416 upstream	Y39A3CL.3
1773382	C	T	nongenic	748 into	Y39A3CL.4b,Y39A3CL.4c
1773382	C	T	nongenic	827 into	Y39A3CL.4a
1791372	G	A	nongenic	2237 into	Y39A3CL.2
1819219	G	A	nongenic	-904 upstream	Y39A3CL.5b.1
1819219	G	A	nongenic	-906 upstream	Y39A3CL.5a,Y39A3CL.5b.2
1961520	T	G	nongenic	-3669 upstream	R155.1b.2
1961520	T	G	nongenic	414 into	R155.1a.2,R155.1b.1,R155.1b.3

Start	Reference Base	Sample Base	Class	Description	Gene
1961520	T	G	nongenic	415 into	R155.1a.1
1966630	G	A	nongenic	-4695 upstream	R155.1a.1
1966630	G	A	nongenic	3077 into	R155.2
2143372	G	A	nongenic	-8583 upstream	Y48G9A.3
2143372	G	A	nongenic	8156 into	Y48G9A.4
2311086	G	A	nongenic	-130 upstream	Y54F10BM.11
2311086	G	A	nongenic	-3336 upstream	Y54F10BM.2
2327180	C	A	nongenic	273 into	Y54F10BM.12
2327180	C	A	nongenic	291 downstream	Y54F10BM.2
2679513	G	A	missense	GCT->ACT[Ala->Thr]	H19M22.2b

## Auflistung der Mutanten für Don Moermans Million Mutation Project

**Tabelle 18: Stämme, die im Zuge von Don Moermans Million Mutation Project sequenziert werden**

Nummer	Einfriernummer	Phänotyp
1	GE5290	steril
2	GE5311	Elongationsdefekt
3	GE5312	kranke Pretzel
4	GE5397	Polynukleär/Defekt in erster Zellteilung
5	GE5401	Oozytenablage
6	GE5405	Schicksalstransformation
7	GE5416	Schicksalstransformation
8	GE5417	Schicksalstransformation
9	GE5545	Zelltod-Defekt
10	GE5553	Adhäsions-/Morphogenesedefekt
11	GE5612	Polynukleär/Defekt in erster Zellteilung
12	GE5613	Schicksalstransformation
13	GE5615	Zellzyklusdefekt
14	GE5623	kranke Pretzel
15	GE5624	Adhäsions-/Morphogenesedefekt
16	GE5625	Oozytenablage
17	GE5631	Schicksalstransformation
18	GE5637	Polynukleär/Defekt in erster Zellteilung
19	GE5641	Polynukleär/Defekt in erster Zellteilung
20	GE5649	Adhäsions-/Morphogenesedefekt
21	GE5661	Schicksalstransformation
22	GE5667	Zellzyklusdefekt
23	GE5774	Oozytenablage
24	GE5776	Schicksalstransformation
25	GE5777	kranke Pretzel
26	GE5782	Zelltod-Defekt
27	GE5923	Elongationsdefekt
28	GE5926	steril
29	GE5930	steril

Nummer	Einfriernummer	Phänotyp
30	GE5935	Zelltod-Defekt
31	GE5936	Zelltod-Defekt
32	GE5946	Schicksalstransformation
33	GE5950	Zellzyklusdefekt
34	GE5958	Adhäsions-/Morphogenesedefekt
35	GE5961	Schicksalstransformation
36	GE5963	Elongationsdefekt
37	GE5969	Oozytenablage
38	GE5972	kranke Pretzel
39	GE6067	Polynukleär/Defekt in erster Zellteilung
40	GE6071	Adhäsions-/Morphogenesedefekt
41	GE6075	Zellzyklusdefekt
42	GE6077	Schicksalstransformation
43	GE6078	kranke Pretzel
44	GE6080	Schicksalstransformation
45	GE6084	kranke Pretzel
46	GE6086	kranke Pretzel
47	GE6088	Schicksalstransformation
48	GE6116	Schicksalstransformation
49	GE6118	Oozytenablage
50	GE6120	kranke Pretzel
51	GE6121	Polynukleär/Defekt in erster Zellteilung
52	GE6130	Elongationsdefekt
54	GE6177	steril
55	GE6185	kranke Pretzel
56	GE6187	Zellzyklusdefekt
57	GE6188	steril
58	GE6225	Adhäsions-/Morphogenesedefekt
59	GE6226	Schicksalstransformation
60	GE6227	Zelltod-Defekt
61	GE6232	Schicksalstransformation
62	GE6233	Polynukleär/Defekt in erster Zellteilung

Nummer	Einfriernummer	Phänotyp
63	GE6247	krankte Pretzel
64	GE6252	Schicksalstransformation
65	GE6257	Zellzyklusdefekt
66	GE6259	Schicksalstransformation
67	GE6264	unnatürliches Cytoplasma
68	GE6272	Oozytenablage
69	GE6273	Elongationsdefekt
70	GE6275	Schicksalstransformation
71	GE6278	Adhäsions-/Morphogenesedefekt
72	GE6280	steril
73	GE6291	Schicksalstransformation
74	GE6302	Schicksalstransformation